

Aus dem Institut für Immunologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich Kabelitz)  
am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel,  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

# **Charakterisierung neuer Substrate der Aspartatprotease Cathepsin D nach Stimulation des TNF-Rezeptors 1**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von  
**Jan Klawitter**

Kiel 2017

1. Berichterstatter

Prof. Dr. rer. nat. S.Schütze

2. Berichterstatter

Prof. Dr.med. M. Krause

Tag der mündlichen Prüfung:

3.September 2018

Zum Druck genehmigt:

3.September 2018

Prof. Roider

(Vorsitzender des Promotionsausschusses)

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	1
1.1	TNF alpha / TNFR1	1
1.2	Signaltransduktion des TNFR1	3
1.3	Nichtapoptotische Signaltransduktion	3
1.4	Apoptose	5
1.4.1	Intrinsischer Signalweg	6
1.4.2	Extrinsischer Signalweg	7
1.5	Cathepsin D	10
1.6	HSP90	12
1.7	TCP1 alpha	15
1.8	GARS-AIRS-GART	17
1.9	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	20
2.1	Material	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	20
2.1.3	Antikörper	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Zellkultur	23
2.2.2	siRNA, shRNA und CRISPR /Cas9	23
2.2.3	In-vitro-Cathepsin D-Verdau	27
2.2.4	Immunpräzipitation	27
2.2.5	SDS-PAGE	28
2.2.6	Westernblot	29
2.2.7	Immunfluoreszenzanalyse	31
2.2.8	Massenspektrometrie (ATOMS)	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	34
3.1	HSP90	34
3.1.1	TNF induzierte Spaltung von HSP90 durch CTSD	34
3.1.2	Kolokalisation von HSP90 und Cathepsin D	38
3.1.3	Massenspektrometrische Charakterisierung der HSP90 Spaltfragmente	38

3.1.4	Herunterregulation der CTSD-Expression durch RNAi und CRISPR/Cas9.....	41
3.2	Substrat TCP1 alpha/TRiC .....	46
3.2.1	TNF stimulierte Degradation von TCP1 alpha .....	46
3.2.2	Kolokalisation von TCP1 alpha und Cathepsin D .....	49
3.2.3	Massenspektrometrische Bestimmung der CathepsinD-Spaltstellen .....	49
3.3	Substrat GARS-AIRS-GART .....	52
3.3.1	Spaltfragmente von GARS-AIRS-GART nach TNF-Stimulation.....	52
3.3.2	Kolokalisation von GARS-AIRS-GART und Cathepsin D.....	54
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>55</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>71</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>72</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>73</b>

# 1 Einführung

## 1.1 TNF alpha / TNFR1

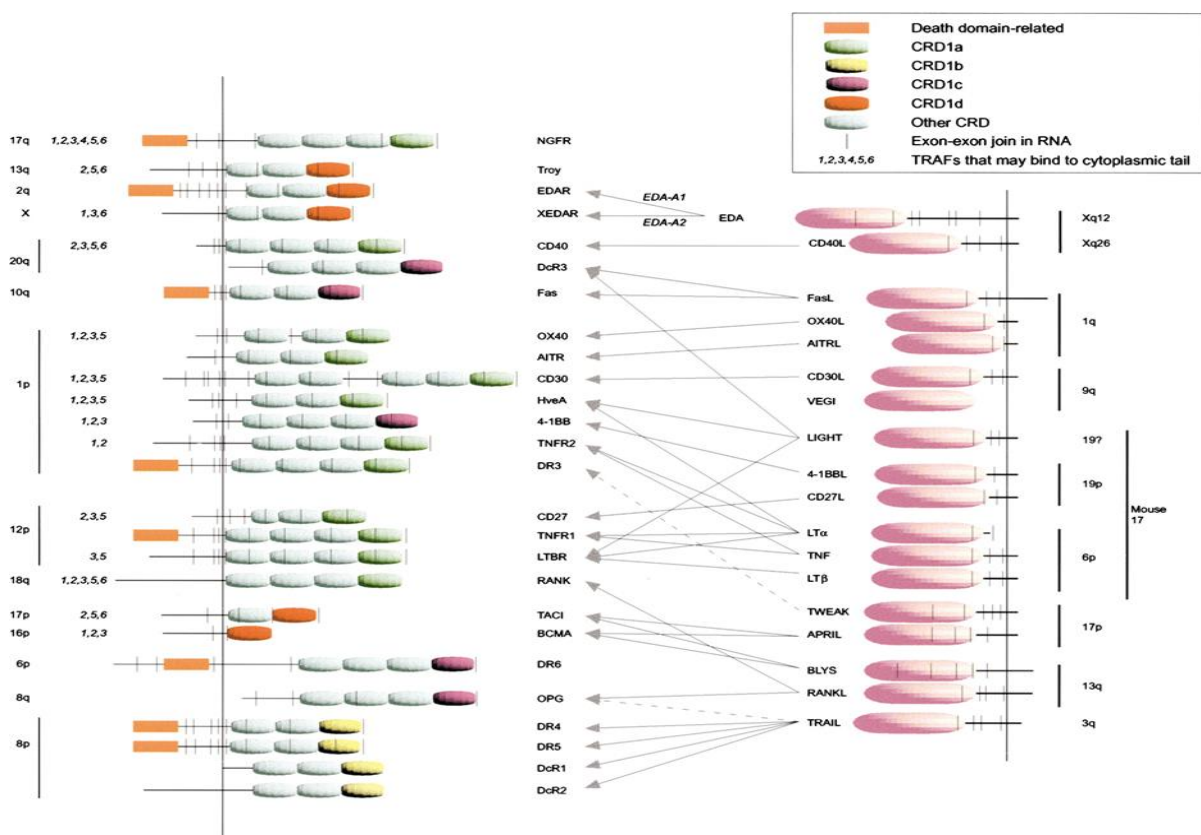
Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF), auch als Kachektin oder *tumor necrosis factor ligand superfamily member 2* (TNFSF2) bezeichnet, ist ein Zytokin aus der Gruppe der TNF-Ligand /TNF-Rezeptor-Superfamilie. Diese umfasst neben TNF über 40 weitere Liganden und korrespondierende Rezeptoren, zu denen unter anderem CD95, TRAIL und RANKL gehören. Der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR) bildet zusammen mit 7 weiteren Rezeptoren aus dieser Gruppe (DR3, DR4, DR5, DR6, NGFR, EDAR und Fas) die Untergruppe der so genannten Todesrezeptoren (*deathreceptors*/DR), denen durch ihre intrazelluläre *deathdomain* (DD, siehe unten) am Rezeptor eine besondere Stellung im Rahmen der Signaltransduktion zukommt (Locksley et al., 2001).

Entdeckt wurde TNF *in vivo* und *in vitro* bei Experimenten mit L929-Fibrosarkomzellen der Maus, die mit Lipopolysacharid beziehungsweise BCG behandelt wurden. In diesen konnte eine Reduktion der Tumormasse nach TNF-Aktivierung nachgewiesen werden (Carswell et al., 1975). Gebildet wird TNF nach Stimulation überwiegend in aktivierten Makrophagen (Sorimachi et al., 1999), Monozyten aber auch in Keratinozyten und Fibroblasten (Vassalli et al., 1992), aktivierten T-Lymphozyten (Reissfelder et al., 2015), Kardiomyozyten (Yu et al., 2014) oder neuronalem Gewebe (Gahring et al., 1996). Seine Stellung als pleiotropes Zytokin wird deutlich durch die Rolle des Proteins in so unterschiedlichen zellbiologischen Prozessen wie Proliferation und Differenzierung (Battegay et al., 1995), Inflammation (Hernandez-Pondo et al., 1994) und Apoptose (Heinrich et al., 2004; Wajant et al., 2003). Dementsprechend umfänglich und diversifiziert präsentiert sich die medizinisch-klinische Anwendung. Chronisch entzündliche Erkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa können im therapeutischen Stufenschema mit anti-TNF-Antikörpern (Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Golimumab und Certolizumab pegol) behandelt werden (Agarwal et al., 2011), ebenso wie rheumatoide Arthritis und Psoriasis (van Bezooijen et al., 2015).

TNF wird zunächst als 26 kDa große Pro-Form im Endoplasmatischen Retikulum als membranständige Form (mTNF) synthetisiert, dann an die Zellmembran transloziert und dort integriert. TNF-Liganden sind Typ II Transmembranproteine; ihr N-Terminus ist intrazellulär, während der C-Terminus extrazellulär lokalisiert ist. Innerhalb dieser membranständigen Form wird durch das Enzym *TNF-alpha-converting-enzyme* (TACE) aus der extrazellulären Domäne eine 17 kDa große Form solubilisiert (sTNF). Diese kann trimerisiert sowohl an den TNFR1 als auch an den TNFR2 binden. Alle bekannten TNF-Familienliganden binden als Trimere (Zhang et al., 2004).

Die TNFR1/-2 sind Typ-I Transmembranproteine, charakterisiert durch einen extrazellulären N-Terminus, der durch TNFR-familienpezifische cysteinreiche Domänen (CRD) definiert ist. Diese sind jeweils 40 Aminosäuren umfassende, durch Disulfidbindungen geformte Pseudorepeats, welche eine bis sechs Domänen umfassen können. Der *B-cell activating factor receptor* (BAFR), ein Mitglied der TNFR-Superfamilie, bildet eine Domäne. Der TNFR enthält insgesamt vier, CRD1 bis CRD4, wobei CRD2 und CRD3 für die Ligandenerkennung verantwortlich sind (Smith et al., 1994). Jede Domäne wird aus zwei der folgenden Module

gebildet: A1, A2, B1, B2, C2, D2 und X2. Hierbei kodieren die Buchstaben für den Faltungsgrad und die Ziffern bestimmen die Anzahl der Disulfidbindungen. CRD2 beispielsweise beinhaltet die Module A1 und B2 und bindet damit an spezifische Liganden-Untereinheiten (Banner et al., 1993). Für eine erfolgreiche Rezeptor-Liganden-Interaktion ist es notwendig, dass die Rezeptormonomere in trimerisierter Form auf der Zellmembran vorliegen. Zu diesem Zweck befindet sich am TNFR1 am aminoterminalen Ende des Rezeptors eine *preligand assembly domain* (PLAD), die eine Oligomerisierung des TNFR durch Selbstassemblierung vor der Ligandenbindung ermöglicht. Eine Entfernung der PLAD führt zum Abbruch der Signaltransduktion auf dieser Stufe (Chan et al., 2000).



**Abbildung 1-1. Todesrezeptoren und ihre Liganden.** Aufgeführt sind rechtsseitig die Liganden aus der TNF-Superfamilie, der für sie kodierende Genlocus sowie der ligandenspezifische Rezeptor. Linksseitig ist die jeweilige extrazelluläre Domäne des Rezeptors mit seinen cysteinreichen Strukturen (CRD) dargestellt (Banner et al., 1993).

## 1.2 Signaltransduktion des TNFR1

Todesrezeptoren besitzen intrazellulär eine 80 Aminosäuren umfassende *deathdomain* (DD) (Guicciardi und Gores, 2009). Diese ist notwendig, um das apoptotische Signal weiterzuleiten. Der TNFR1 wird auf nahezu allen humanen Zellen exprimiert und aktiviert die Apoptose unter Beteiligung der Adaptorproteine *TNFR1-associated deathdomain* (TRADD) und *Fas-associated deathdomain* (FADD). Der TNFR2 ist überwiegend auf Zellen des Immunsystems (Ware et al., 1991) lokalisiert und aktiviert über *TNF-receptor-associated factor 2* (TRAF2) den *nuclear factor-kappa B* (NF-κB). Dadurch wird ein antiapoptotisches Signal transduziert, das Zellüberleben und Proliferation gewährleistet (Faustman et al., 2010).

Nach Bindung des löslichen homotrimerisierten Liganden an den TNFR1 kommt es zu einer Dissoziation des die Autoaktivierung verhindernden SODD-Proteins (*silencer of death domains*) von der *death domain* des TNFR1 (Jiang et al., 1999). Hierdurch liegt die DD des TNFR1 kurzzeitig für eine Interaktion mit anderen DD-tragenden Proteinen frei. Der zytoplasmatische Anteil des TNFR2 enthält, obwohl von TNF stimuliert, keine DD.

Im Rahmen dieser Arbeit wird auf die weitere Signaltransduktion des TNFR2 nicht näher eingegangen.

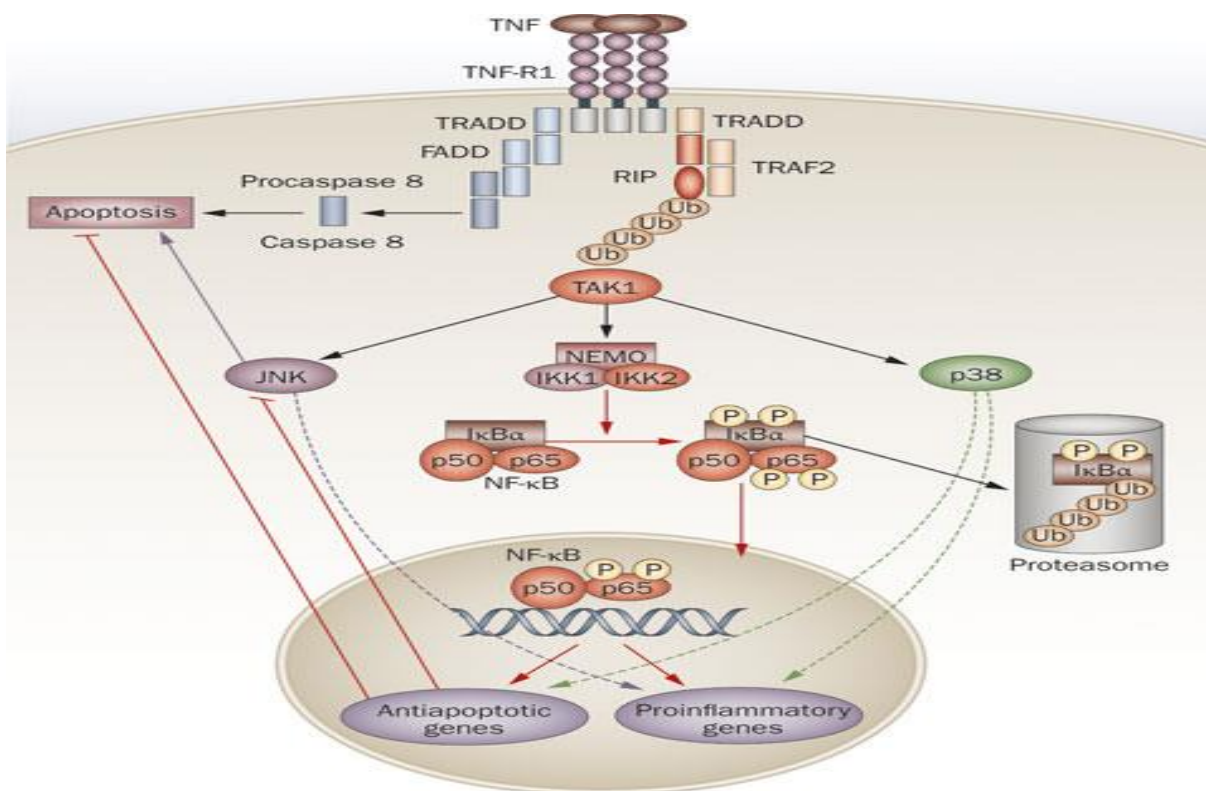
## 1.3 Nichtapoptotische Signaltransduktion

Nach Dissoziation von SODD kann nun an die freigewordene *death domain* (DD) das *TNF-receptor associated deathdomain-Protein* (TRADD) durch homophile Interaktion an den TNFR1 binden (Hsu et al., 1995). TRADD fungiert dabei als eine *assembly platform*, die nun die Bindung des *TNF receptor associated factor 2* (TRAF2) und der Serin-/Threoninkinase *receptor interacting kinase 1* (RIP 1) ermöglicht (Hsu et al., 1996). Hierdurch kann jetzt spezifisch der *nuclear factor-kappa-B*-Signaltransduktionsweg (NF-κB) initiiert werden. Dazugehörige Proteine der NF-κB-Rel-Familie umfassen Nf-κB 1/p50, NF-κB 2/p52 sowie Rel-A, Rel-B und c-Rel.

Diese sind durch eine spezifische Rel-Homologiedomäne (RHD) charakterisiert und für die Interaktion mit dem Inhibitor I-κB verantwortlich. Darüberhinaus ermöglichen sie die Lokalisation der nukleären DNA-Bindungsstelle und sind für die Dimerisierung des Transkriptionsfaktors essentiell (Verma et al., 1995). Im Zytoplasma dimerisiert vorliegende NF-κB/Rel-Proteine befinden sich zusammen mit ihrem Inhibitor I-κB in einem inerten Zustand, wobei *ankyrin repeats* des I-κB die *nuclear localization signals* (NLS) der NF-κB-Dimere maskieren (Flynn et al., 1995). Die Aktivierung des IKK-Komplexes, bestehend aus den Kinasen IKK1, IKK2, IKKγ/NEMO, homodimerisiertem HSP90 und cdc37 (Chen et al., 2002) führt zur Phosphorylierung und Ubiquitinierung mit konsekutiver proteasomaler Degradation des I-κB. Hierdurch wird das NF-κB-Dimer freigesetzt und zum Nukleus der Zelle transloziert,

wo es, vermittelt über seine Rel-Domäne, stimuluspezifisch als Transkriptionsfaktor definierte Loci in der DNA binden kann. Dadurch wird Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben reguliert.

Über eine TNF-Stimulation der Zelle wird ebenso die Aktivierung von Kinasen der *stress activated protein kinase* (SAPK)/*c-Jun N-terminal kinase* (JNK)-Gruppe induziert (Shaulian et al., 2002). Wie *mitogen activated protein kinases* (ERKs) werden die JNK-Isoformen durch eine zweifache Phosphorylierung an Tyrosin- und Threoninresten aktiviert und können so in den Zellkern translozieren. Dort verstärken sie die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie *activator protein 1* (AP 1) durch N-terminale Phosphorylierung. AP 1 ist stark an Proliferation und Inhibition der Apoptose beteiligt (Karin et al., 2001).

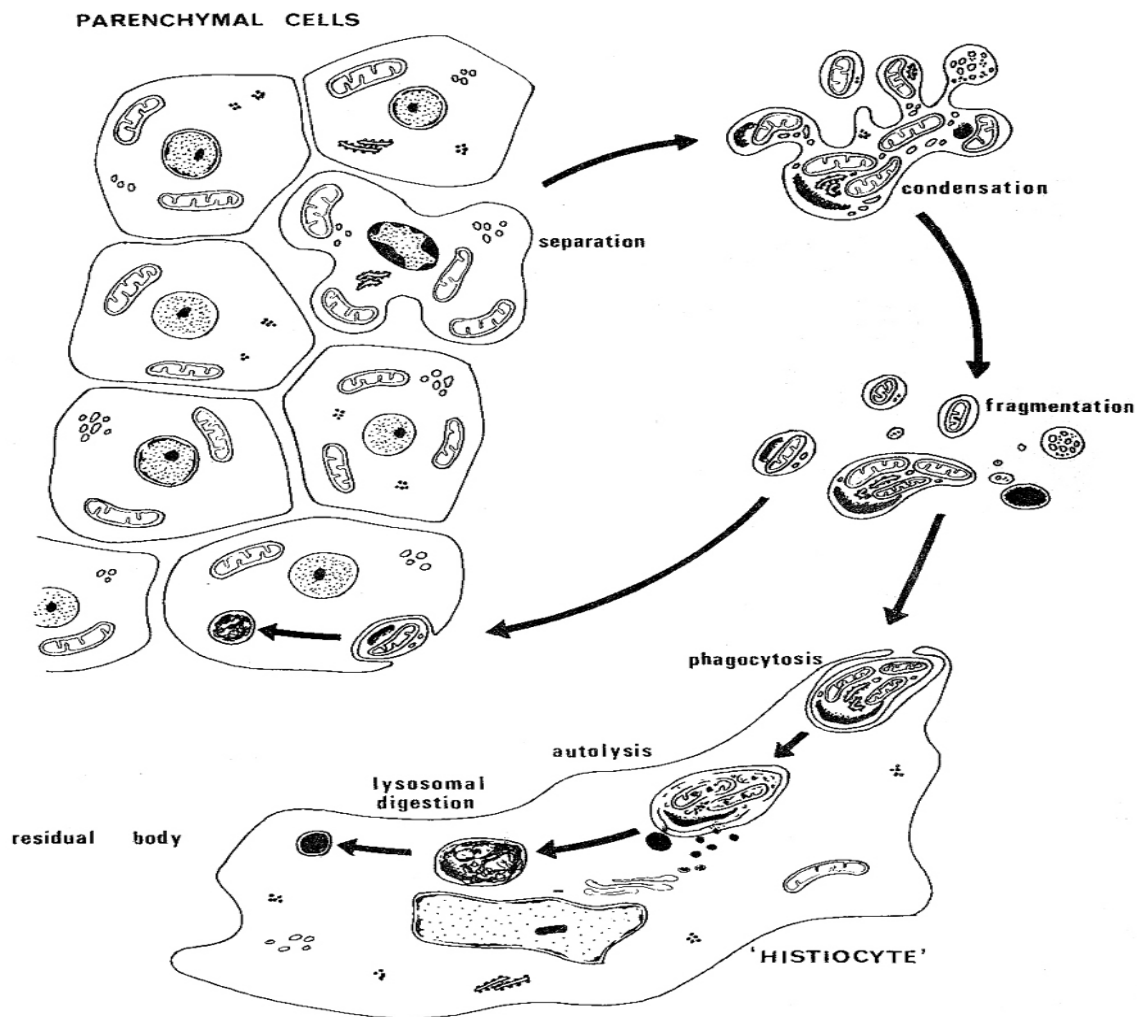


**Abbildung 1-2. Aktivierung des NF-κB Pathway.** Nach TNF Bindung an den Rezeptor werden TRADD, TRAF 2 und RIP an die intrazelluläre *deathdomain* rekrutiert und aktivieren dadurch den IKK (IKK1, IKK2 und IKKγ)-Komplex. Die durch den Inhibitor IκB gebundenen Dimere p50/p65 können nun phosphoryliert an ihre DNA-Kernsequenz binden und so antiapoptotische und proinflammatorische Gene aktivieren (Lüdde und Schwabe, Nature Review Gastroenterology 2011)



## 1.4 Apoptose

Kerr prägte 1972 den Begriff der Apoptose, der mit abfallen oder herunterfallen übersetzt werden kann (Kerr et al., 1972). Zellbiologisch beschreibt der Terminus eine im Kontrast zur Nekrose stehende Form des zellulären Todes. Dabei kommt es zu licht- und elektronenmikroskopisch identifizierbaren morphologischen Veränderungen. Initial findet nach Zellseparation und Kondensation eine Fragmentierung chromosomaler DNA (Karyorhexie) statt, welcher abschließend eine Zellkernpyknose mit der Bildung sogenannter *apoptotic bodies* folgt. Diese werden abschließend von Makrophagen phagozytiert und lysosomal degradiert oder im Rahmen der Endozytose vom benachbarten Zellverbund aufgenommen.



**Abbildung 1-3. Zeichnungen in Anlehnung an elektronenmikroskopische Darstellungen des apoptotischen Prozesses.** Nach Herauslösung einer Zelle aus ihrem Verband wird über ein Schrumpfen (Kondensation) und eine Aufteilung (Fragmentation) der Zellkompartimente eine Aufnahme fragmentierter Korpuskel in Makrophagen oder andere Zellen ermöglicht, die dabei einer Wiederverwendung zugeführt werden können. Inflammatorische Prozesse wie im Falle der Nekrose konnten nicht beobachtet werden (aus Kerr et al., 1972).

### 1.4.1 Intrinsischer Signalweg

Die Initiierung der Apoptose kann über zwei verschiedene Wege erfolgen, einen extrinsischen, auch als ligandeninduziert bezeichneten und den intrinsischen, mitochondrialen Weg. Beim intrinsischen Weg gelten zelluläre Stimulatoren wie Hitze, Hyperosmolarität, UV-Licht,  $\gamma$ -Strahlung oder ROS (*reactive oxygen species*) als mögliche Auslöser der apoptotischen Reaktionskaskade (Caldarone et al., 2004). Dabei vermitteln Proteine aus der *B-cell lymphoma-family-2* (Bcl-2) über pro- und antiapoptotische Mitglieder die zelluläre Signaltransduktion. Hierbei lassen sich drei funktionale Gruppen unterscheiden. Zur Gruppe 1 werden die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> gezählt. Sie besitzen vier sogenannte Bcl-2 Homologiedomänen (BH1 bis BH4). In die zweite Gruppe lassen sich die proapoptotischen Mitglieder Bax, das überwiegend im Zytosol nachweisbar ist und Bak einordnen, die über jeweils drei Homologiedomänen verfügen (BH1 bis BH3). Letztendlich formen Bid und Bad als ebenfalls proapoptotische Mitglieder die Gruppe 3, in der die Proteine nur eine BH-3-Homologiedomäne besitzen. Die Homologiedomänen vermitteln die Homo- und Heterodimerisierung einzelner pro- und antiapoptotischer Bcl-2-Proteine in der äußeren Membran der Mitochondrien (Wolter et al., 1997).

Auf diese Weise bewirken sie direkt oder indirekt über eine Konformationsänderung des *voltage dependent anion channel* (VDAC) in der äußeren Mitochondrienmembran eine Porenbildung. Hierdurch ist es möglich, dass Proteine aus dem intermembranösen Raum der Mitochondrien in das Zytosol gelangen können. Vor allem Cytochrom c, Procaspasen, *second mitochondria-derived activator of caspase* (SMAC) und *apoptosis inducing factor-1* (AIF-1) werden so zeitversetzt freigesetzt (Kroemer et al., 2007). AIF-1 transloziert nach zytosolischer Freisetzung in den Zellkern und vermittelt dort die Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation (Daugas et al., 2000). Gleichzeitig kommt es zu einem Zusammenbruch des über der inneren Mitochondrienmembran bestehenden Membranpotentials  $\Delta\psi_m$ . Das freigesetzte Cytochrom c bewirkt die zytosolische Assemblierung des sogenannten Apoptosomes, eines Multiproteinkomplexes bestehend aus *apoptotic protease activating factor 1* (APAF-1), Procaspase-9, ATP und Cytochrom c (Zou et al., 1999). Dieser aktiviert konsekutiv Caspase 9, die dann abschließend die Caspasen-3, -6 und -7 aktiviert.

Caspasen (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) sind Cysteinproteasen, die in ihrem aktiven Zentrum einen Cysteinrest besitzen und Zielproteine an ihrer carboxyterminalen Seite an spezifischen Aspartatresten hydrolysieren. Hierbei können Initiatorcaspasen (Caspase -2, -8 und -10) von Effektorcaspasen (Caspasen -3, -6, -7 und -9) unterschieden werden. Initiatorcaspasen enthalten Prodomänen. Bei Caspase-2 und -9 die *caspase recruitment domain* (CARD) und die *death effector domain* (DED) für Caspase-8 und -10.

Darüber können caspaseinitiierte Assemblierungsplattformen wie der *death inducing signalling complex* (DISC), das Apoptosom, das PIDDosom oder das Inflammasom geschaffen werden, um das intrazelluläre Signal zu transduzieren (Lamkanfi et al., 2007).

### 1.4.2 Extrinsischer Signalweg

Die Initiierung des extrinsischen Weges beginnt durch die Bindung eines spezifischen Liganden an seinen Rezeptor. Im Falle des TNFR1 führt dabei trimerisiertes TNF zur intrazellulären Rekrutierung der Adaptermoleküle TRADD, *FAS-associated death-domain adaptor molecule* (FADD) und Pro-Caspase 8 an die zytoplasmatisch lokalisierte *death domain* (DD) des Rezeptors (Hsu et al., 1996), um daraus den DISC zu bilden (Scaffidi et al., 1999).

In Bezug auf die strukturelle Organisation nach TNF-Stimulation am TNFR1 bestehen divergierende Ansichten. Micheau und Tschopp stellen ein Modell vor, bei dem es zur Bildung zweier sogenannter Komplexe (Komplex I und II) kommt. Im Komplex I binden nach Stimulation die Proteine TRADD, RIP1, TRAF2 und c-IAP1 an den Rezeptor und vermitteln in plasmamembrangebundenen *lipid rafts* die Initiierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges über die Formierung des IKK-Komplexes.

Zur Bildung des Komplex II ist die Endozytose des Liganden-Rezeptorverbundes notwendig. Hierbei wurde die Clathrin vermittelte Endozytose für den TNFR1 genauer beschrieben (Schneider-Brachert et al., 2004). Nach Bindung des Liganden an den TNFR1 kommt es zu einer Rekrutierung von Ligand-Rezeptorverbünden in membranständige Mikrodomänen, den *clathrin coated pits* (CCP). Anschließend lagert sich auf zytosolischer Seite Clathrin über *adaptor protein complex-2* (AP2) der Plasmamembran an. Durch eine Interaktion des AP2 mit der GTPase Dynamin kommt es zu einer Abschnürung eines zytoplasmatischen Vesikels, das jetzt als TNF-Rezeptosom bezeichnet wird. Diese Formation fusioniert nach einem Abstreifen des Clathringerüsts mit frühen Endosomen und dann später zu MVB. Von hier aus wird durch die Ligand-Rezeptorkomplexe die Signaltransduktion fortgeführt (Le Roy und Wrana, 2005). Daneben existieren Clathrin unabhängige Formen der Endozytose (Mayor und Pagano, 2007).

Nach Endozytose kommt es unter nicht näher bestimmten Modifizierungen zu einer Dissoziation von TRADD vom Rezeptor, wodurch dessen DD freiläge, um nun FADD und nachfolgend Procaspase 8 binden zu können. Der Komplex II besteht somit aus TRADD, RIP1 TRAF2 und FADD mit Procaspase 8. Der TNFR1 konnte im Komplex II nicht nachgewiesen werden (Micheau und Tschopp, 2003).

Untersuchungen von Schneider-Brachert et al. konnten die Rezeptorinternalisierung genauer definieren und sehen den internalisierten TNFR1 in einem endosomalen Kompartiment (TNF-Rezeptosom) an TRADD, FADD und Procaspase 8 gebunden, um den DISC zu bilden. Eine Dissoziation zu diesem Zeitpunkt vom Rezeptor wurde nicht gesehen (Schneider-Brachert et al., 2004 und 2006). TNFR1 Mutanten, denen die Internalisierungsdomäne am Rezeptor fehlte oder Punktmutationen am Tyr-Gln-Arg-Trp -TNFR1-Internalisierungsmotiv aufwiesen, führten zu einem Abbruch der Signalkaskade. Eine Transfektion mit dem Adenovirus 14.7K konnte die Endozytose, DISC-Formierung und TNF-medierte Apoptose ebenfalls verhindern, hatte jedoch keinen Einfluss auf den TNF-initiierten NF- $\kappa$ B Signalweg (Schütze et al., 2008; Guicciardi 2009). Aktuelle Ergebnisse konnten dieses Modell weiter unterstützen.

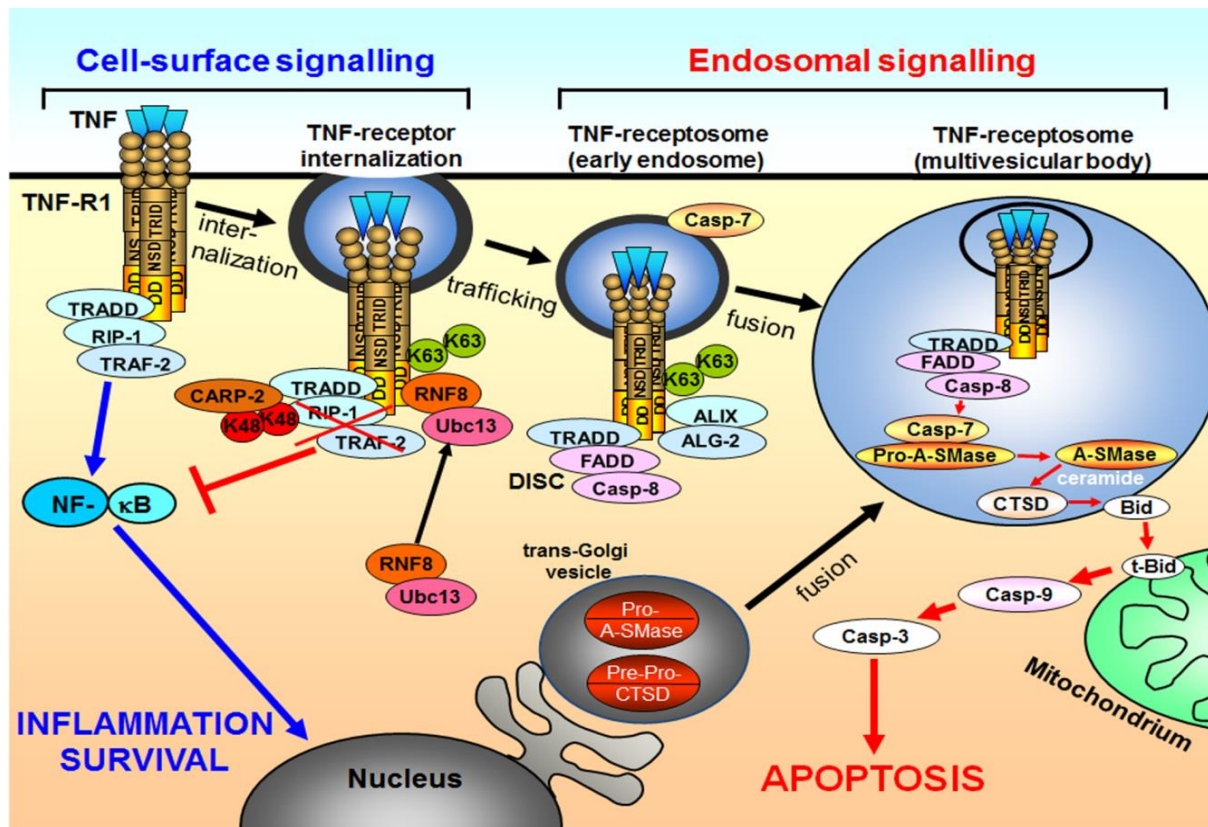
Innerhalb der Signalkaskade, oberhalb der DISC-Formierung, kommt es direkt nach Bildung des Komplexes-I an der Zelloberfläche zu einer Bindung der E3-Ubiquitin-Proteinligase *Ringfingerprotein 8* (RNF8) mit dem Ubiquitin-Konjugationsenzym Ubc13 (E2) an den TNFR1.

Darauffolgend wird der aktivierte Rezeptor K63-ubiquitiniert mit konsekutiver Initialisierung der Internalisierung. K63-Ubiquitinierung führt nicht zur proteasomalen Degradation sondern ermöglicht eine regulatorische Einflussnahme auf die Signaltransduktion. RNF8 defiziente Zellen inhibierten die TNFR1-Internalisierung (Fritsch et al., 2014). Nachdem über längere Zeit die Annahme bestand, die Internalisierung des Rezeptors sei ausschließlich zur Terminierung des Signals vonnöten, erscheinen nun vermehrt Hinweise darauf, dass die Internalisierung als eine notwendige Voraussetzung zur Aktivierung, Diversifizierung, Amplifizierung oder Arrangierung des Signalweges anzusehen ist (Sorkin und von Zastrow, 2009).

Die Anlagerung von Caspase 8 an den DISC wird über zwei Proteine reguliert. Auf der einen Seite bindet das Protein *ALG-2 interacting-protein X* (Alix/AIP) an den TNFR1, entgegengesetzt kann *apoptosis-linked gene-2* (ALG-2) binden. ALG-2 besitzt eine Bindungsstelle für Caspase 8 (Mahul-Mellier et al., 2008). Autoproteolytisch aktivierte Caspase 8 ist so imstande über zwei differenzierte Wege die Apoptose weiterzuführen. Bei Typ 1-Zellen ist die durch die Rezeptoraktivierung geschaffene Signalstärke stark genug, so dass Caspase 8 direkt die Effektorcaspase 3 spalten und aktivieren kann. In Typ 2-Zellen spaltet und aktiviert Caspase 8 nach Fusion des TNF-Rezeptosoms mit trans-Golgivessikeln zum MVB die lysosomale Aspartatprotease Cathepsin D (CTSD). CTSD vermag daraufhin zytosolisches Bid zu aktivem, trunkiertem Bid (tBid) zu spalten und damit den intrinsischen Weg der Apoptose als Signalverstärker zu nutzen.

NF- $\kappa$ B induziert die Expression von FLICE (*FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme*)-inhibitory protein (FLIP), das an den DISC rekrutiert, Caspase 8 inhibiert und so den weiteren apoptotischen Weg blockiert (Irmeler et al., 1997). Eine Supprimierung des NF- $\kappa$ B Signalweges wird durch CARP-2, einer Ubiquitin-Proteinligase (E3), herbeigeführt. Diese ist an endozytotischen Vesikeln lokalisiert und nach Internalisierung des TNF-Rezeptors imstande eine K48-Ubiquitinierung von RIP1 am Rezeptor zu bewirken, die damit der proteasomalen Degradation zugeführt werden kann (Liao et al., 2008).

Nachdem es zu einer vollständigen Ausbildung des DISC gekommen ist, fusionieren trans-Golgivessikel, die Pro-A-Smase und Pre-pro-CTSD enthalten mit den TNF-Rezeptosomen. Diese bilden ein endosomales Kompartiment, die sogenannten *multivesicular bodies* (MVB). In diesen kann durch die aktivierte Caspase 8 Caspase 7 gespalten werden, die essentiell für die weitere Signaltransduktion ist (Edelmann et al., 2011). Die so aktivierte A-SMase generiert den *lipid second messenger* Ceramid (Schütze et al., 1992; Kolesnick und Krönke, 1998), der die Aspartatprotease Cathepsin D (CTSD) aktiviert, die somit in das Zytosol transloziert (Heinrich et al., 1999, 2004 und 2006). Eine Zielstruktur von CTSD stellt das zytosolische proapoptotische Protein der Bcl-2 Familie Bid dar, das als trunkierte Form tBid im Mitochondrium die Freisetzung von Cytochrom c bewirkt. Hieran anknüpfend kann über die Bildung des Apoptosomes und die Initiierung der Effektorcaspase 9 das apoptotische Signal weiter transduziert werden.



**Abbildung 1-4. TNFR-1 Signaltransduktion.** Sowohl der anti- als auch der pro-apoptotische Signalweg werden durch Ligandenbindung eingeleitet. Anschließend werden TRADD, RIP1 und TRAF-2 an den Rezeptor rekrutiert, um nach Internalisierung NF- $\kappa$ B aus seinem Inhibitorenkomplex zu lösen, der so als Transkriptionsfaktor wirken kann. CARP-2 vermittelt über ubiquitiniertes RIP-1 eine Inhibition des NF- $\kappa$ B Signalweges. Der Bindung des Liganden an seinen Rezeptor folgt im apoptotischen Weg die K63-Ubiquitinierung durch RNF8 und Ubc13, die so die Internalisierung des Rezeptor-Ligandenkomplexes ermöglichen. Die TNF-Rezeptosomen rekrutieren nun TRADD, FADD und über ALIX und ALG-2 Procaspase 8 an die DD, um den DISC zu formieren. Das TNF-Rezeptosom fusioniert schließlich mit trans-Golgivessikeln zu einem MVB, in dem über die kaskadengleiche Aktivierung von Caspase 8, Caspase 7, A-SMase und CTSD Bid zu tBid zytosolisch gespalten wird und der intrinsische Weg der Apoptose in die Aktivierung der Effektorcaspasen mündet (entnommen und modifiziert aus Tchikov et al., 2011).

## 1.5 Cathepsin D

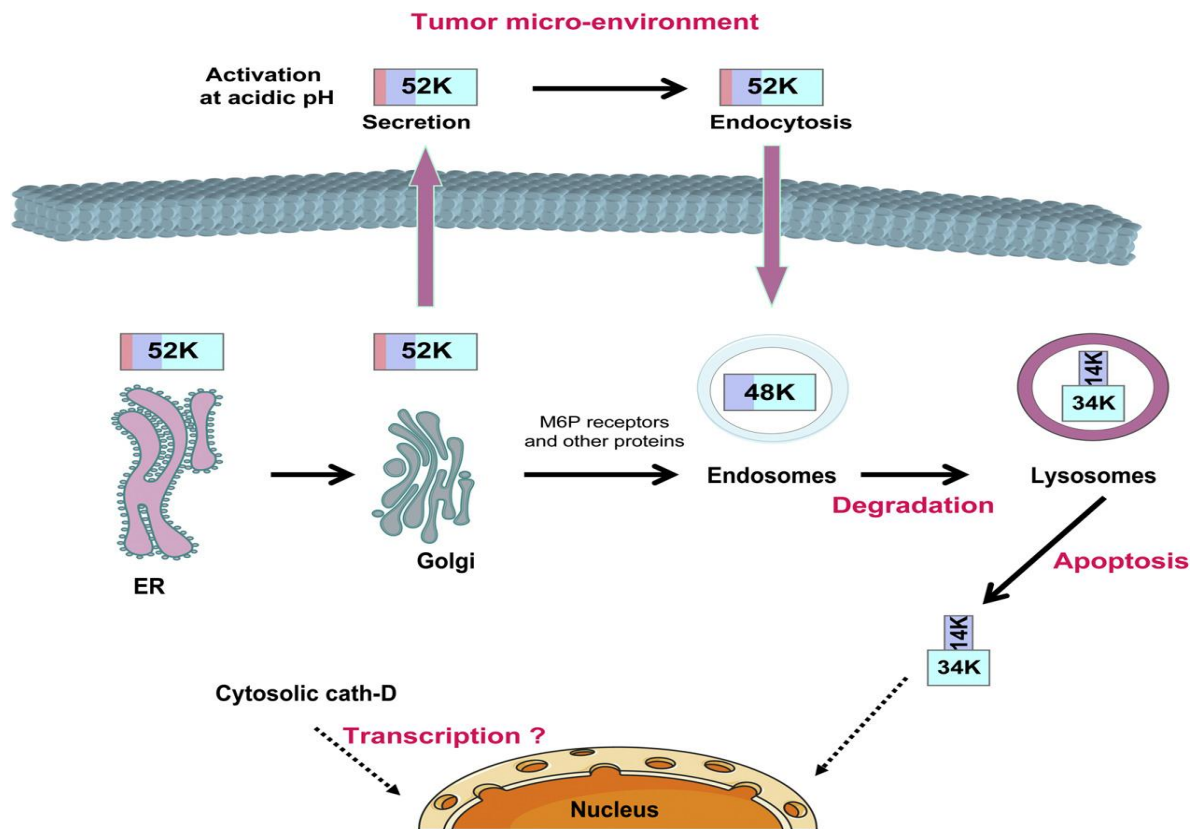
Cathepsin D (EC 3.4.23.5) ist eine lysosomale Aspartatprotease und gehört neben Pepsin und Renin der Pepsin-Superfamilie an (Cunningham et al., 1976). Es spaltet vorzugsweise -Phe-Phe-, -Leu-Tyr-, -Tyr-Leu- und -Phe-Tyr-Peptidbindungen (Dunn et al., 2000). Cathepsin D (CTSD) wird als 412 Aminosäuren (aa) langes Prä-Pro-Cathepsin D im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) mit einer N-terminalen 20 aa umfassenden Signalsequenz synthetisiert. Als inaktives Procathepsin D (52 kDa) wird es cotranslational über die Membran des ER transloziert, nachdem die Signalsequenz abgespalten wurde.

N-terminal existiert nun das 44 aa umfassende Propeptid. Anschließend kommt es zu einer N-Glykosylierung an den Asparaginresten 134 und 263 (Nummerierung nach UniProtKB/Swiss-Prot) mit nachfolgender Speicherung in den Golgi-Vesikeln (Fortenberry et al., 1995). Hier werden die Oligosaccharide an ihren Mannoseresten in Position sechs phosphoryliert. Anschließend werden sie vom kationenunabhängigen Mannose-6-Phosphatrezeptor (MPR300) erkannt und in Transportvesikel gespeichert. Die so direktionierten Vesikel gelangen über den M-6-P-Signalweg zu Endosomen und schließlich zu den Lysosomen.

Es existieren neben dem M-6-P-Signalweg noch zwei von ihm unabhängige Wege. Zum einen soll Procathepsin D mit Pro-Saponin interagieren (Gopalakrishnan et al., 2004), zum anderen soll der zwischen ER und trans-Golginetzwerk zirkulierende multifunktionale Rezeptor Sortilin Procathepsin D binden können (Canuel et al., 2008).

Auf dem Weg in das endo- bzw. lysosomale Kompartiment wird Cathepsin D durch Abspaltung des Propeptides in eine aktive 48 kDa Intermediärform überführt und unter den aziden Bedingungen der lysosomalen Umgebung durch Cathepsin B oder Cathepsin L in die mature Form (Laurent-Matha et al., 2006) prozessiert. Die mature Form besteht aus einer carboxyterminalen *heavy chain* (34 kDa) und einer aminoterminalen *light chain* (14 kDa), die über hydrophobe Wechselwirkungen verbunden sind.

Cathepsin D besitzt eine Vielzahl physiologischer Funktionen in unterschiedlichen Organsystemen. So verändert sich das Expressionsmuster des Enzyms unter Wundheilungsverhältnissen oder dem hyperproliferativen Hautzustand der Psoriasis (Kawada et al., 1997). Neben anderen pathologischen Veränderungen, bei denen Cathepsin D eine zentrale Funktion zukommt, wie zum Beispiel der Alzheimer Erkrankung (Selkoe et al., 2001) oder der Atherosklerose (Duran et al., 2007), liegt der Betrachtungsschwerpunkt auf den Neoplasien. Viele Tumorentitäten, dabei besonders kolorektale Tumoren und Neoplasien der Mamma, sezernieren erhöhte Mengen von Procathepsin D in den Extrazellularraum. Diese wirken auto- und/oder parakrin als Wachstumsfaktoren und erhöhen dabei das invasive und metastatische Potential der Tumorzellen signifikant (Koblinski et al., 2000). Die Gründe für eine extrazelluläre Sekretion sind dabei nicht vollständig verstanden. Neben einer defekten Azidifizierung endosomaler Kompartimente (Kokkonen et al., 2004) werden beispielsweise auch Störungen in der Interaktion zwischen Procathepsin D und dem Mannose-6-Rezeptorsystem als Ursache angesehen (Baumgrass et al., 1997). Im Plasma der Zelle interagiert Cathepsin D mit  $\alpha$ 2-Makroglobulin und wird in nichtazidem Milieu inaktiviert, jedoch nicht in azider Umgebung. Neben dieser proteolytischen Eigenschaft besitzt Cathepsin D auch die Fähigkeit, über eine direkte Interaktion zu wirken (Fusek et al., 1994).



**Abbildung 1-5. Reifung des Cathepsin D.** Pre-Pro-CTSD wird im ER als inaktive 52 kDa Form gebildet. Über die Distributionsfunktion des Golgi-Apparates kann es zum einen unter Heranreifung in das aktive 48 kDa Pro-CTSD in endosomalen Kompartimenten lokalisiert sein, zum anderen als 52 kDa Form in die azide Tumor-Mikroumgebung entlassen werden, um dort autokrin oder parakrin als Wachstumsfaktor zu fungieren (entnommen aus Masson et al., 2010).



## 1.6 HSP90

Als Chaperone werden solche Proteine bezeichnet, die zum einen die Aggregation fehlgefalteter Proteine verhindern sollen und zum anderen die naszierende Polypeptidkette in eine funktionelle Struktur überführen können.

Das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) ist funktionell ein Mitglied aus der Gruppe der Chaperone, die nach ihrer Funktion in fünf unterschiedliche Klassen differenziert werden können: HSP100/Cip, HSP90, HSP70/DNAJ, HSP60/GroEL und die kleinen Hitzeschockproteine (sHSP) (Buchner, 2002). Unter Bedingungen zellulären Stresses wie Hitze, Sauerstoffmangel oder dekompenzierter Abweichungen im Säure-Basen-Haushalt kommt es zu einer zellulären Hochregulation des Expressionsniveaus dieser Proteine. Die einzelnen Hitzeschockproteine bilden dabei ein komplexes interdependentes Netzwerk (siehe Abbildung 1-6).

In der Mehrzahl sind Chaperone Hitzeschockproteine (Ellis et al., 1991) und binden an hydrophobe Stellen des nichtnativen Proteins co- und posttranslational, ohne inter- oder intramolekulare Interaktionen einzugehen (Deuring und Bukau, 2004).

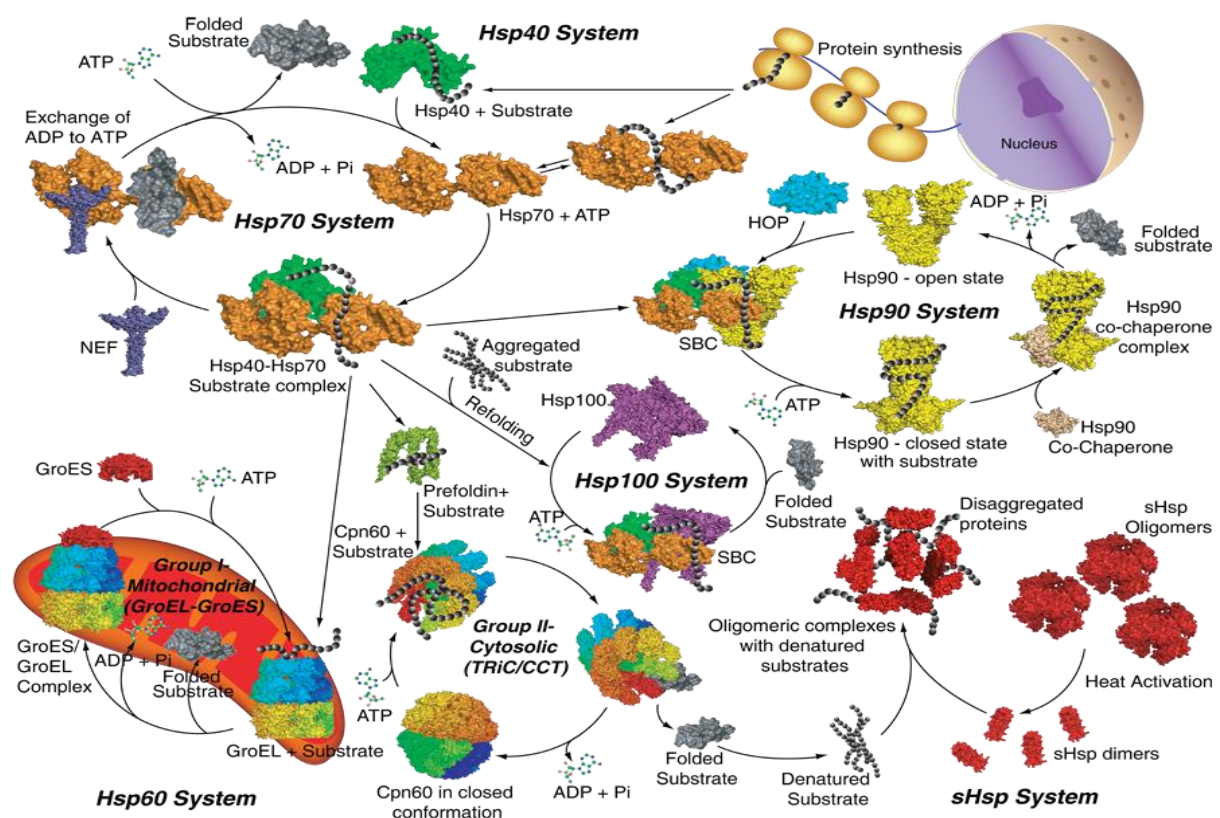


Abbildung 1-6. Netzwerk der Hitzeschockproteine. Erläuterungen siehe Text



HSP90 ist im Zytosol eukaryoter Zellen anzutreffen und gehört quantitativ zu dessen abundanten Proteinen. Auch im nicht aktiven Zustand macht es 1-2 % der Gesamtproteinmenge der Zelle aus (Beckmann et al., 1990). Homologe Formen existieren in anderen zellulären Kompartimenten.

So findet sich im Endoplasmatischen Retikulum Grp94 (Richter et al., 2007) und im Mitochondrium TRAP1 (Dollins et al., 2007) als strukturanaloges Protein mit teilweise abweichenden Funktionen, die in diesem Zusammenhang nicht erläutert werden.

HSP90 erscheint im Zytosol in zwei Isoformen. Einerseits als HSP90 $\alpha$ , dessen Expression unter zellphysiologischen Stressbedingungen induziert wird und andererseits als HSP90 $\beta$ , das konstitutiv exprimiert wird (Langer et al., 2003). Strukturell liegt es als ein Homodimer vor, wobei jedes Monomer aus drei flexibel miteinander verknüpften Abschnitten besteht. N-terminal befindet sich die ATP-Bindungsdomäne (N-Domäne), die über das Protein *linker* mit der M-Domäne verbunden ist. C-terminal schliesst sich eine Dimerisierungsdomäne an (C-Domäne), an der ein konserviertes MEEVD-Erkennungsmotiv die Interaktion mit TPR-enthaltenden Co-Chaperonen ermöglicht (Li et al., 2013).

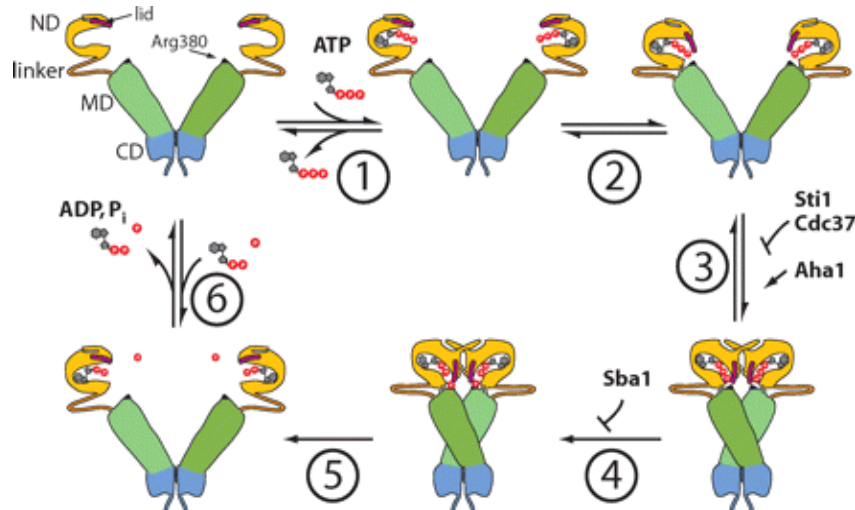
Eine Substratbindung ist bei HSP90 direkt von der ATP-Aktivität abhängig. Co-Chaperone modulieren die Aktivität der ATPase und vermitteln die Rekrutierung der Klientenproteine an den HSP90-Komplex. Klientenproteine sind größtenteils Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren und Steroidhormonrezeptoren (Pratt et al., 1997), wobei HSP90 im Gegensatz zu HSP70 und GroEL/ES weniger für die *de-novo-Synthese* dieser Proteine essentiell ist als vielmehr für deren finale Reifung (Nathan et al., 1997).

Am Anfang der Klientenrekrutierung steht die Bindung von ATP an die N-Domäne (Schritt 1 in Abbildung 1-7) von HSP90, gefolgt von einem Verschluss der ATP-Bindungstasche durch das N-Domänensegment *lid* (Schritt 2). Anschließend kommt es zu einer transienten Dimerisierung der *lid*-Abschnitte auf den N-Domänen durch reziproke Interkalierung (Schritt 3).

Unmittelbar darauf folgt eine Konformationsänderung des gesamten Proteinkomplexes. Diese führt zu einer ipsilateralen Annäherung der N-Domäne an die M-Domäne unter einer Helikalisierung des gesamten Proteins. Dies sind die notwendigen Voraussetzungen, die als nächsten Schritt eine ATP-Hydrolyse ermöglichen (Schritt 5). Nach erfolgter Hydrolyse dissoziieren die N-Domänen voneinander. Das N-Domänensegment *lid* öffnet die ATP-Bindungstasche (Schritt 6) und nach Freisetzung von ADP und Pi wird der Zyklus beendet und das Ausgangsniveau wieder hergestellt.

Die ATPase-Aktivität ist essentiell für den energieverbrauchenden Prozess der Proteinfaltung und kann durch spezifische Kofaktoren inhibiert oder stimuliert werden. Der Kofaktor Sti1/Hop bindet über seine TPR-Domäne an den C-Terminus und inhibiert so die ATPase-Aktivität. Dadurch unterbleibt die Dimerisierung des N-Terminus, ohne die eigentliche ATP-Bindung zu beeinflussen (Richter et al., 2003). Über den genauen inhibitorischen Wirkmechanismus der zyklinabhängigen Kinase Cdc37 herrscht noch Unklarheit (Prodromou et al., 1999). Der Kofaktor P23/Sba1 stabilisiert die N-terminal dimerisierte Konformation im fortgeschrittenen Stadium des ATP-Zyklus und wirkt inhibierend über eine Reduzierung des ATP-Turnover. Zu den stimulierenden Kofaktoren zählt der ATPase-Aktivator Aha1, der nach Bindung eine

Modulierung der M-Domäne in der Umgebung des katalytisch aktiven Arg380 bewirkt und so das Erreichen des helikalisierten Zustandes beschleunigt.



**Abbildung 1-7. Konformationszyklus von HSP90.** Entnommen aus Wandinger et al., 2008. Erläuterungen siehe Text.

Eine andere Möglichkeit der Regulation des ATP-Zyklus stellen posttranslationale Modifizierungen wie Acetylierung (Scroggins et al., 2007), S-Nitrosylierung (Garcia-Gardena et al., 1998) und Phosphorylierung dar (Dougherty et al., 1987). So wird beispielhaft HSP90 durch die Interaktion mit dem Kofaktor PP5/Ppt1 über dessen TPR-Domäne dephosphoryliert. Eine Deletion von PP5/Ppt1 führte zu einer signifikanten Reduzierung der Reifung verschiedener Substratproteine (Wandinger et al., 2006).

Obwohl experimentelle Beweise dafür vorhanden sind, dass HSP90 an allen drei Domänen Bindungsstellen für Substrate besitzt, existiert noch keine abschließende Vorstellung darüber, wie genau der HSP90-Substratkomplex sich konstituiert und seine Konformationsdynamik begründet (Vaughan et al., 2006).

Untersuchungen aus den letzten beiden Jahrzehnten haben versucht, die medizinische Relevanz und mögliche pharmakologische Anwendungen zu beleuchten. Ferrarini et al. zeigten, dass in humanen Tumorzellen die Expression von HSP90 gegenüber nicht tumorös differenzierten Zellen zwei- bis zehnfach erhöht ist (Ferrarini et al., 1992) und stießen so nachfolgende Untersuchungen an, die die Rolle von HSP90 in definierten Tumorentitäten zum Gegenstand hatten (Nanbu et al., 1998).

Von besonderem Interesse erscheint dabei die Tatsache, dass zu den über 200 bekannten Klientenproteinen (aktuell dazu: <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90facts.pdf>, abgerufen 09/2016) eine Anzahl von Onkoproteinen wie cKIT, *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2)/neu, *mutant epidermal growth factor receptor* (EGFR), das BCR-ABL Fusionsprotein und BRAF (Normant et al., 2011) gehören. Desweiteren ist HSP90 zum einen

mitverantwortlich für die erst durch korrekte Faltung aktiven Formen apoptotischer Klienten wie Bcl-2 oder Apaf-1. Zum anderen besteht über die Aktivierung der Matrixmetalloproteinase MMP-2 eine Beteiligung an Metastasierung und Gewebeinvasion (Valastyan et al., 2011). Aus der exponierten Stellung dieser Faktoren bei der Tumorprogression entstanden Überlegungen, durch Modulation oder Inhibierung der HSP90/Klienteninteraktion den Progress zu beeinflussen.

Dafür erschien eine Inhibition der ATPase-Aktivität der N-Domäne eine vielversprechende Herangehensweise zu sein. Der Inhibitor soll kompetitiv an die N-Domäne binden und zu einem Arrest im Chaperonzyklus führen. Die Klientenproteine können nicht mehr an HSP90 binden und werden proteasomal degradiert (Tsutsumi et al., 2009). Das benzochinoide Ansamycin Geldanamycin stellte den Prototyp dieser Substanzklasse dar (Stebbins et al., 1997). Aufgrund stark ausgeprägter hepatotoxischer Nebenwirkungen kam diese Substanz jedoch nicht zu klinischer Anwendung. Ein Derivat des Geldanamycin ist Tanespimycin (17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, abgekürzt 17-AAG), das als erster Inhibitor den Eingang in klinische Studien fand, da es in präklinischen Modellen eine antitumoröse Aktivität in Kolon-, Brust-, Ovarial- und Hauttumoren zeigen konnte (Saif et al., 2013). Eine zum Geldanamycin zwar verminderte Toxizität in Kombination mit einer geringen Responserate führten schließlich hier zum Abbruch von Phase-2-Studien beim metastasierten Mamma- und Hautkarzinom (Gartner et al., 2012).

## 1.7 TCP1 alpha

*T-complex-Protein-1* Untereinheit alpha (TCP-1 alpha) ist eines von insgesamt 8 Untereinheiten bildenden Proteinen, die zusammen den *chaperonin containing TCP1 complex* (CCT), auch *TCP-1 ring complex* (TRiC) genannt, bilden.

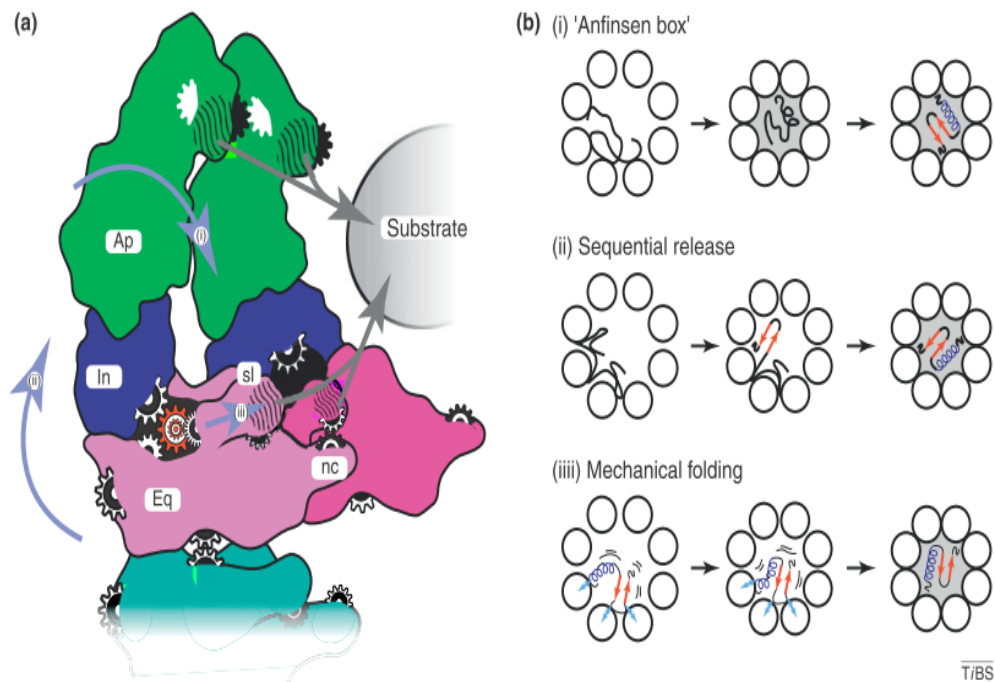
Chaperonine können dabei zu zwei morphologisch verschiedenen Gruppen zusammengefasst werden. Der ersten Gruppe (Typ I) lassen sich das im Zytoplasma von Bakterien vorkommende GroEL/GroES, eine mitochondriale Isoform (HSP 60) und das in Chloroplasten anzutreffende *Rubisco binding protein* zuordnen. Archaeen mit ihren zytoplasmatischen Thermosomen und das im Zytosol von Eukaryoten lokalisierte CCT/TRiC konstituieren sich zur zweiten Gruppe (Typ II) nach Gutsche et al., 1999.

Chaperonine sind Katalysatoren und stellenweise auch Initiatoren posttranslationaler Modifikationen (Horwich et al., 2007). Sie tragen wesentlich zur Zellteilung über eine Wechselwirkung mit Cyclin E und Cdc 20 bei und sind dabei schätzungsweise zu 10 Prozent an der Faltung des gesamten Proteoms beteiligt (Yam et al., 2008). Für die zytoskelettalen Proteine Aktin und Tubulin ist die Interaktion mit TRiC essentiell (Sternlicht et al., 1993). Nachfolgend wird nur noch auf die Chaperonine der Gruppe II eingegangen.

Die einzelnen Untereinheiten besitzen jeweils eine Größe von 60 kDa und liegen oligomerisiert in zwei *back-to-back* angeordneten Ringen vor. Bezeichnet werden die jeweiligen Untereinheiten mit griechischen Buchstaben (CCT $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ , $\zeta$ , $\eta$  und  $\theta$ ). Morphologisch kann eine den Chaperonen ähnliche Differenzierung in drei Domänen nachgewiesen werden. Der die Basis bildenden äquatorialen Domäne wurde die ATP-Bindungsstelle zugewiesen. Zusätzlich erfolgt über sie der Informationsaustausch während des Faltungsvorganges zwischen den einzelnen Ringen. Die sich anschließende intermediäre Region stellt lediglich eine strukturelle Verbindung zwischen der äquatorialen und der apikalen Region her. Die apikale Region fungiert als Ort der Substratbindung (Horovitz und Willison, 2005). Dazu besitzt sie an ihrer Peripherie eine helikale Protrusion, die in der Lage ist, hydrophobe Bindungspartner zu erkennen (Ditzel et al., 1998). Im Gegensatz zu Chaperoninen der Gruppe I existiert in der Gruppe II keine Assistenz durch Co-Chaperonine. Ungefaltete Proteine werden durch das heterohexamere molekulare Chaperon Prefoldin in die Chaperoninkavität transportiert (Martin-Benito et al., 2007). Eine dem Prefoldin ähnliche Funktion wird einer Interaktion des TRiC mit dem Protein HSP70 zugesprochen (Cuellar et al., 2008).

Der eigentliche Proteinfaltungsvorgang bedingt eine Konformationsänderung des Chaperonin unter ATP-Hydrolyse. Dafür essenziell ist ein effektiver und spezifischer Substraterkennungsmechanismus, der auf zwei loci des Proteins verteilt ist. Zum einen werden ungefaltete Polypeptide an der apikalen Domäne über helikale Protrusionen erkannt, die besonders entscheidend für die Erkennung des Von-Hippel-Lindau Tumorsuppressorproteins sind (Spiess et al., 2006). Zum anderen existiert in der äquatorialen Domäne ein sogenannter *sensor loop*, der die Interaktion zwischen Substrat und einer Untereinheit der Domäne erkennt und ebenfalls eine Substratspezifität garantieren kann (Pereira et al., 2012). Da der Chaperoninkomplex aus zwei Ringen besteht, ist es prinzipiell möglich, dass gleichzeitig zwei Substratmoleküle mit ihm reagieren.

Nachdem das zu faltende Protein der Kavität zugeführt wurde und ATP an der Äquatorialdomäne gebunden hat, kommt es unter der Hydrolyse des ATP zur Konformationsänderung des Komplexes mit Verschluss der Kavität und Triggerung der Freisetzung des Proteins. Da für die Einleitung dieses Prozesses nicht notwendigerweise alle acht ATP-Bindungsstellen besetzt sein müssen kann es so zu einer Aufhebung der oktagonalen Symmetrie kommen. Dies soll den Faltungsvorgang substratspezifisch unterstützen. Der genaue Ablauf der Proteinfaltung bleibt bis zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt. Vermutet wird eine hierarchische und sequentielle Abfolge (von  $\alpha \rightarrow$  nach  $\zeta$ ) unter Berücksichtigung der Topographie der Untereinheiten des CCT und einer spezifischen Wechselwirkung zwischen den beiden Ringen (Illustration in Abbildung 10, modifiziert nach Yebenes et al., 2011).



**Abbildung 1-8. Mechanik des CCT Komplexes.** (a) **Funktionelle und morphologische Darstellung des Faltungszyklus anhand eines Monomers und zweier benachbarter Untereinheiten.** Blaue Pfeile: potentielle Bewegungen während des Zyklus: (i) Flexibilität der apikalen Domäne, (ii) Bewegungen der Untereinheiten innerhalb des Ringes und (iii) Bewegungsspielraum des sensor loops zur Substraterkennung. Die grauen Pfeile beschreiben die Substratinteraktion mit der apikalen Domäne und dem sensor loop in der äquatorialen Domäne. Die Zahnräder symbolisieren die Fähigkeit zum topographischen Rearrangement beim Wechsel zwischen offenem und geschlossenem Zustand. (b) **Allgemeine Faltungsmechanismen der Chaperonine.** (i) Jeder Zirkel steht für eine Untereinheit, der graue Hintergrund für den geschlossenen Zustand. Die Anfinsen-Boxtheorie postuliert die Faltung des Proteins im geschlossenen Zustand. (ii) Der sequentiellen Abfolge liegt neben der Anfinsentheorie die Bedeutung einer spezifischen Reihenfolge zugrunde. (iii) Neben der sequentiellen Abfolge soll im mechanischen Modell die mechanische Verformung zusätzlich die Proteinfaltung unterstützen.

## 1.8 GARS-AIRS-GART

Die Purine Adenin und Guanin entstehen aus der Grundform Inosinat. Dieses wird in einem mehrschrittigen enzymatischen Prozess aus der Ausgangssubstanz Phosphoribosylpyrophosphat generiert. Dabei kann zum einen der Weg über eine *de-novo-Synthese* beschritten werden oder zum anderen ein Reutilisationspfad genutzt werden, der als *salvage pathway* bekannt ist. Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf die *de-novo-Synthese*.

Auf Chromosom 21q22.1 befindet sich der Genlokus, der für das trifunktionale 110 kDa große Protein GARS-AIRS-GART kodiert (Brodsky et al., 1997).

Daneben entsteht durch eine weitere Polyadenylierungssequenz im Intron 11 im Wege alternativen Splicings carboxyterminal das monofunktionale 50 kDa Protein GARS. Diese sind essentiell für drei Reaktionen des zehnschrittigen enzymatischen Prozesses bis zum Inosinat. GARS (Glyzinamid-Ribonukleotid-Synthetase) bestimmt den zweiten, AIRS (Amino-Imidazol-Ribonukleotid-Synthetase) den dritten und GART (Glyzinamid-Ribonukleotid-Transformylase) den fünften Reaktionsschritt (Banerjee et al., 2009). Neben der überragenden Bedeutung, die ATP und GTP im zellulären Metabolismus unzweideutig zukommt, sind Purine ebenfalls an der Entwicklung des Nervensystems durch Formung trophischer Effekte und Induzierung der Apoptose beteiligt. GARS wird hierbei konstitutiv exprimiert, wohingegen GARS-AIRS-GART postnatal stark bis zur Nachweisgrenze abfallen soll (Banerjee et al., 2012). Jaeken et al. machten bereits 1984 auf einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Konzentration von Succinylpurinen in Körperflüssigkeiten und Symptomen einer psychomotorischen Retardierung aufmerksam. In Zusammenhang mit der Akuten Lymphoblastischen Leukämie konnte bei Vorliegen der TEL-AML 1 Translokation eine reduzierte *de-novo-Synthese* nachgewiesen werden, die auf ein reduziertes Expressionsniveau des GARS-AIRS-GART-Proteins zurückgeführt werden konnte. Von Banerjee vermutete und aufgrund des Genlocus naheliegende Beziehungen zum Krankheitsbild der Trisomie 21, die sich in einer Persistenz oder Erhöhung des Expressionsniveaus über den Basiswert hinaus zeigen sollten, wurden nicht bestätigt. Vielmehr scheint nach Banerjee eine organ- und entwicklungsspezifische lokotemporäre Verteilung vorzuliegen.

## 1.9 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In experimentellen Vorarbeiten wurden CTSD-defiziente MEF-Zellen mit und ohne Cathepsin D nach Protokoll stimuliert. Hierbei sollen potentiell neue Substrate der Aspartatprotease identifiziert und gelelektrophoretisch visualisiert werden.

Um die Problematik der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen identischer Proben mit einer 2D-Gelelektrophorese zu umgehen, wurde das Verfahren der 2D-Differenzgelelektrophorese (2D-DIGE) gewählt. Ünlü et al. beschrieben diese Methode, mittels derer es möglich ist, Unterschiede zwischen zwei Proteinproben auf einem einzigen Gel zu visualisieren (Ünlü et al., 1997). Dazu wurden die beiden zu untersuchenden Proben an Lysinresten mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, wobei darauf geachtet wurde, dass bei distinkten fluoreszierenden Eigenschaften der Einfluss auf die Molekulargröße und Ladung des Proteins nicht signifikant verändert wird. Anschließend wurden die Proben miteinander gemischt und einer konservativen 2D-Auftrennung nach isoelektrischem Punkt (pI) und Molekulargröße (Da) unterzogen. Vor der Farbstoffmarkierung wurden die Proteinproben mit 10 % TCA präzipitiert und in Markierungspuffer resuspendiert. Die sich anschließende Bildanalyse und massenspektrometrische Aufbereitung der Proben wurde im vorliegenden Experiment nach den Vorgaben von Schmidt et al. von Dr. Jürgen Fritsch aus dem Institut für Immunologie der Universität Kiel durchgeführt (Schmidt et al., 2009).

Untersucht wurden die Proteine HSP90, HSP70, HSP47, TCP1alpha, TCP1theta, GARS-AIRS-GART, PGK, 14-3-3 und Proteinphosphatase 2a, da sie in der Auswertung eine quantitative Veränderung der Signalstärke im Vergleich beider Proben zeigten.

In einer darauffolgenden Untersuchung soll nachgewiesen werden, dass die Spaltung der Substrate durch eine Stimulation der Zellen mit TNF und nachfolgender Aktivierung von Cathepsin D kausal ist, so wie es beispielsweise für das Protein Bid beschrieben ist (Tchikov et al., 2011). Im Speziellen soll dabei zum einen durch den Einsatz von siRNA/shRNA eine stabile CTSD defiziente Zelllinie generiert werden und zum anderen durch Verwendung des Aspartatproteaseinhibitors Pepstatin A untersucht werden, ob eine Unterbrechung der Signaltransduktion beobachtet werden kann.

Die durch Cathepsin D Behandlung an den Substraten entstandenen Spaltungsstellen sollen massenspektrometrisch analysiert werden. Hierbei kommt das ATOMS-Verfahren als ein modifiziertes massenspektrometrisches Verfahren zur Anwendung.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Blotkammer	BioRad, DE
Brutschrank	Memmert, DE
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Scientific, DE
Elektrophoresekammer	Biometra, DE
Heizblock	Eppendorf, DE
Konfokales Laserscanningmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, DE
Labormikroskop	Olympus, DE
Microplate Reader Infinite M 200	TECAN Group Ltd., CH
OctoMACS Separator	Miltenyi Biotec, DE
Pipetten	Eppendorf, DE
Entwicklermaschine	AGFA, DE
Sterilwerkbank Laminar Air HB 2448	Heraeus, DE
Waage	Sartorius, DE
Wasserbad	Köttermann, DE
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, DE
Zentrifuge Avanti J-25I	Beckman Coulter, USA

#### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (40% w/v)	Serva, DE
Adhäsionsobjektträger ImmunoSelect	Squarix, DE
Albumin Standard (2,0 mg/ml)	Thermo Scientific, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, USA



BCA-Assay	Pierce, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, USA
Cathepsin D	LOXO, DE
Cathepsin D Activity Assay Kit	Abnova, Taiwan
CRISPR/Cas9-Plasmid	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, DE
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Scientific, USA
DMEM	Invitrogen, USA
ECL Detektionsreagenz	GE Healthcare, DE
Ethyldiamintetraessigsäure ( EDTA )	Sigma Aldrich, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, USA
Glycin	Serva, DE
HSP90	Novus, USA
µMACS Säulen	Miltenyi Biotec, DE
Magermilchpulver	Frema, DE
Methanol	Merck, DE
N,N,N',N' – Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, DE
Natriumacetat	Merck, DE
Natriumhydroxid	Merck, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, DE
Page-Ruler® Prestained Protein Ladder	Fermentas, DE
PBS	Biochrom AG, DE
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, DE
Pepstatin A	Sigma Aldrich, USA
Plasmidmaxipräparation(Maxi-Prep)	Qiagen, USA
Polyvinylidenfluorid (PVDF)	Carl Roth, DE
RPMI 1640	Invitrogen, USA
Protein G MicroBeads	Miltenyi Biotec, DE

Röntgenfilme	GE Healthcare, GB
siRNA Transfektionsmedium	Santa Cruz, USA
siRNA Transfektionsreagenz	Santa Cruz, USA
siRNA Cathepsin D	Santa Cruz, USA
SureSilencing shRNA Plasmid/Cathepsin D	Qiagen, USA
TCP 1 alpha	Novus, USA
Trypsin/EDTA	Biochrom AG, DE
ZVAD-FMK	Biochem, Schweiz

### 2.1.3 Antikörper

Für die Westerblotanalysen wurden folgende primäre und sekundäre Antikörper verwendet

Bezeichnung	Firma	Einsatz	Verdünnung
14-3-3 (C-16) : sc-1019	Santa Cruz	Primär	1:1000
BID (FL-195) : sc-11423	Santa Cruz	Primär	1:1000
Anti-Cathepsin D(Ab-2) Rabbit pAb	Merck-Millipore	Primär	1:1000
Anti-Cathepsin D ab6313	Abcam	Primär	1:1000
GART (S-20): sc-83255 rabbit	Santa Cruz	Primär	1:1000
HSP90 (4F10):sc-69703	Santa Cruz	Primär	1:1000
HSP47 (H-300) : sc-8352	Santa Cruz	Primär	1:1000
PP2A-A $\alpha$ (6G3): sc-56954	Santa Cruz	Primär	1:1000
TCP 1 alpha (4E215):sc-58862	Santa Cruz	Primär	1:1000
$\alpha/\beta$ -Tubulin Antibody # 2148	CellSignaling	Primär	1:1000
HSP90 (C45G5) Rabbit : #4877	CellSignaling	Primär	1:1000
Rabbit anti-mouse IgG-HRP(315-035-045)	Dianova	Sekundär	1:10000
Goat anti-rat IgG-HRP : sc-2006	Santa Cruz	Sekundär	1:10000
Goat anti-rabbit IgG-HRP # 7074	CellSignaling	Sekundär	1:10000

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente kamen drei Zelllinien zum Einsatz: zum einen Suspensionszellen der humanen monozytären Lymphomzelllinie U937 und zum anderen die adhärenzte humane HeLa-Zelllinie sowie eine CTSD-defiziente murine MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*)-Zelllinie. Suspensionszellen wurden in RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)-1640 Medium kultiviert, dem 5 % (v/v) fetales Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurden. Inkubiert wurden die Zellen im Brutschrank bei 37° C bei einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5 %. Alle 48-50 Stunden wurden die Zellen geteilt und mit frischem Nährmedium versehen. Die HeLa- und MEF-Stämme wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) unter Zugabe von 10 % (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gehalten. Zur Vereinzelung wurde das Nährmedium entfernt, die Zellen in den Kulturflaschen mit PBS gewaschen und abschließend mit 5 ml eines Gemisches aus Trypsin/EDTA 5 min bei 37° C behandelt. Anschließend wurden 20 % der Zellen weiter kultiviert.

### 2.2.2 siRNA, shRNA und CRISPR /Cas9

In einem nächsten Schritt wurde versucht, die Expression der Aspartatprotease Cathepsin D auf genomischer Ebene zu beeinflussen. Dies wurde durchgeführt, um die Wirkung einer Entfernung der Protease auf die Entstehung von Spaltfragmenten bei den Substraten zu beschreiben und dabei ihren Einfluss auf die Signaltransduktion von U937-Zellen nach TNF-Stimulation zu untersuchen. Hierbei wurden siRNA, shRNA und CRISPR/CAS9-Konstrukte für die Experimente eingesetzt.

#### siRNA

Fire und Mello beschrieben erstmals die Verwendung von *small interfering RNA* (siRNA) (Fire und Mello et al., 1998). Dabei findet zuerst das Einbringen von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in das Zytosol der Zelle mit nachfolgender Fragmentierung durch das Enzym Dicer auf eine Nukleotidlänge von 18 bis 25 Basenpaaren statt. Abschließend wird ein Enzymkomplex, der *RNA-induced silencing complex* (RISC), mit der fragmentierten dsRNA beladen. Die dsRNA wird gespalten und eine zum vereinzelt Leitstrang komplementäre mRNA gebunden. Argonautenproteine mit Endonukleaseaktivität unterbinden die weitere Translation der mRNA durch Initiierung der Degradation. Reagenzien der Firma SantaCruz Biotechnology wurden nach folgendem Protokoll angewendet.  $1,5 \times 10^5$  U937 Zellen wurden in eine 6-Well-Kulturplatte mit jeweils 2ml penicillinfreiem RPMI 1640 überführt und für 24 Stunden bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Atmosphäre von 5 % im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden zwei getrennte Reaktionsansätze hergestellt. In Ansatz 1 wurden 5 µl Cathepsin D siRNA in 100 µl siRNA-Transfektionsmedium für jede Transfektion gelöst.

Ansatz 2 enthielt 5 µl siRNA-Transfektionsreagenz in 100 µl Transfektionsmedium pro Transfektion. Beide Ansätze wurden daraufhin mit einer Pipette vorsichtig vermischt und für 45 Minuten bei 20° C Raumtemperatur inkubiert. Direkt im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit 2 ml siRNA-Transfektionsmedium gewaschen und die gemischten Ansätze auf die Zellen gegeben und für 6 Stunden bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank zur Reaktion gebracht. 1 ml RPMI 1640 mit Penicillin und FCS wurde zu den Zellen gegeben und diese für weitere 24 Stunden inkubiert. Aus den transfizierten Zellen wurde zur Erfolgskontrolle eine Westernblotanalyse zum Nachweis von Cathepsin D angefertigt.

Parallel zu diesem Verfahren wurde shRNA benutzt, um die Cathepsin D mRNA herunter zu regulieren. Dieses Experiment wurde unternommen, da U937-Zellen als schwer zu transfizieren gelten (Martinet et al., 2003). Ein anderer Vorteil bei der Verwendung von shRNA liegt in seiner im Vergleich zur siRNA niedrigeren Abbaurate. Dies mag dadurch bedingt sein, dass shRNA durch Integration in das Zellgenom ständig transkribiert werden kann.

Durch Hitzeschock-Transformation wurde das Cathepsin D/shRNA-Plasmid in kompetente *Escherichia coli* Bakterien aufgenommen. Darauf folgte die Gewinnung der Plasmid-DNA durch Plasmidpräparation entsprechend den Herstellerangaben. Abschließend wurden U937-Zellen mit der Plasmid-DNA im Wege der Elektroporation transfiziert.

### shRNA

### Transformation

100 µl *Escherichia coli* des Stammes DH10B wurden mit 10 µg des Plasmids für 30 Minuten auf Eis gebunden. Im Anschluss daran erfolgte die Hitzetransformation durch Überführung in einen Heizblock mit einer konstanten Temperatur von 42° C für 50 Sekunden. Hierdurch wurde eine transiente Permeabilitätserhöhung der Zellmembran erreicht, die es dem Plasmid erleichtern soll in das Zytosol der Zelle zu gelangen. Darauf folgend wurde der Reaktionsansatz für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Im direkten Anschluss daran 1ml des SOC-Medium hinzugegeben, um es für 45 Minuten bei 37°C einwirken lassen zu können. Zur Verteilung auf LB-Agar-Platten mit Penicillin wurde der Ansatz in zwei Verdünnungsebenen in der Fläche verteilt.

LB-Agar (Amp)-Platten		SOC Medium	
Bakto-Agar	5 %	Bakto-Trypton	2 %
Bakto-Trypton	1 %	Hefeextrakt	0,5 %
Hefeextrakt	1,5 %	NaCl	10 mM
NaCl	10 mM	KCl(pH 7,0)	0,25 mM,
Ampicillin	50 µg/ml	Glukose	20 mM

## Plasmidpräparation

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurde eine transformierte *Escherichia coli*-Kolonie selektioniert und mit einem sterilen Holzspatel vorsichtig in 250 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt. Dieses wurde über Nacht bei 37° C im Schüttelinkubator belassen. Am darauffolgenden Tag wurde eine Plasmid-Maxipräparation mit dem Maxi-Prep-Kit auf der Grundlage des Protokolls der Firma Qiagen durchgeführt.

### LB Medium

Bakto- Trypton	1 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	170 mM (pH 7,2)

## Transfektion

Für die Transfektion wurden jeweils  $2,0 \times 10^6$  U937 Zellen in antibiotika- und serumfreiem RPMI 1640-Medium mit 10 µg Plasmid in einer Küvette vermengt. Anschließend wurden die Zellen mit dem BioRad Gene Pulser II mit RF-Modul bei folgenden Geräteeinstellungen gepulst (Spannung 300 Volt, Modulation 100 %, Radiofrequenz 45 kHz, Pulsanzahl 7, Pulsdauer 4 ms Pulsintervall 1 Sekunde). Die Zellen wurden anschließend in eine Zellkulturflasche mit 50 ml vorgewärmtem, antibiotikafreiem RPMI1640-Medium überführt. Nach 24 Stunden im Brutschrank (bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>) wurde eine Erfolgskontrolle aus den transfizierten Zellen durch eine Westernblotanalyse durchgeführt.

## CRISPR/Cas9

Im Gegensatz zu methodischen Ansätzen des *gene-silencing*, bei denen siRNA beziehungsweise shRNA Anwendung findet, nutzt die CRISPR/Cas9-Methode eine direkte Interaktion mit der DNA.

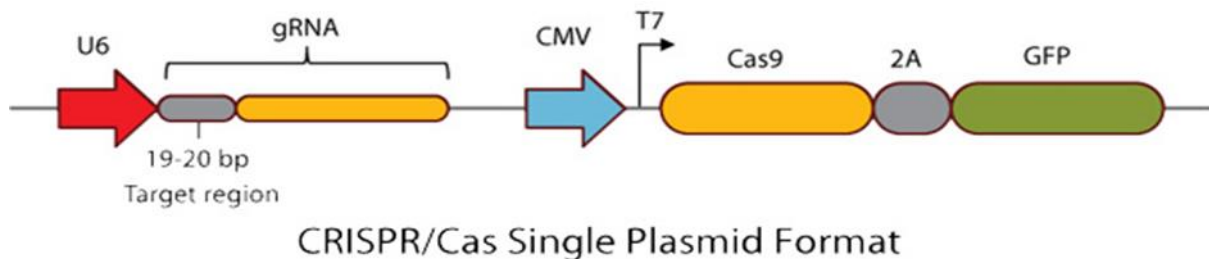
*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)/CRISPR-associated nuclease 9 (Cas9) beschreibt ein neues Verfahren aus dem Bereich des Genom-Editing. Von Charpentier ist es als eine Methode im Rahmen einer Adaptiven Immunität bei Bakterien gegen eindringende Viren beschrieben worden (Charpentier et al., 2012). Kurze DNA-Sequenzen invadierender Viren werden an spezifischen CRISPR-Loci in das Bakteriengenom integriert. Im Falle einer Reinfektion werden diese als CRISPR-RNA (crRNA) transkribiert, an die Cas9 gebunden ist. Über Cas-Proteine erfolgt zum einen die Bindung an Ribonukleotide, zum anderen ermöglicht die Endonukleasefunktion das Entstehen von Doppelstrangbrüchen in der Ziel-DNA.

Cas9 bindet an eine als *crRNA-repeat* bezeichnete Sequenz, an die sich eine *spacer*-Sequenz anlagert. Beide zusammen werden als crRNA bezeichnet. Die *spacer*-Sequenz ist komplementär zur Ziel-DNA und funktionell in der Lage, an sie zu binden. Über Modifizierung der *spacer*-Sequenz ist es möglich, definierte DNA-Abschnitte beispielsweise durch Deletion oder Insertion zu manipulieren. Künstlich hergestellte crRNA, die die definierte *spacer*-Sequenz enthält wird auch als *guide RNA* (gRNA) bezeichnet, wobei für die Bindungsspezifität neben der gRNA nur noch die *protospacer adjacent motif* (PAM)-Sequenz notwendig ist, die aus drei Nukleotiden (NGG) besteht. Für das lokusspezifische Genom-Editing sind als Minimalanforderung nur die Endonuklease Cas9 und die gRNA notwendig.

Um die Expression des Cathepsin D-Gens herunterzuregulieren wurde ein Vektorformat der Firma Sigma Aldrich gewählt, das sowohl die Expressionskassette für Cas9 als auch die gRNA enthält.

Abbildung 2-1 zeigt die Komponenten des CRISPR/Cas9-Plasmids. Der humane U6-Promotor reguliert die Expression der gRNA. Cas9 und GFP werden durch den CMV-Promotor reguliert. Upstream der Cas9-cDNA Sequenz befindet sich eine T7-Promotorsequenz, mit der eine In-vitro-Cas9-GFP mRNA hergestellt werden kann.

Cas9 ist über das Verbindungsprotein 2A an das grünfluoreszierende Protein GFP gebunden. Dieses fluoresziert bei einem Exzitations- bzw. Emissionsmaximum von 483 nm und 506 nm und ermöglicht so eine Kontrolle der Transfektionseffizienz durch *fluorescence activated cell sorting* (FACS).



**Abbildung 2-1. Schematische Darstellung des CRISPR/Cas9-Plasmids.** Die unter der Regulation des humanen U6-Promotors stehende Expression der gRNA und die unter CMV (Cytomegalovirus)-Promotorkontrolle stehende Expression von Cas9-GFP finden durch ein einzelnes Plasmid statt (entnommen aus Sigma Aldrich datasheet zu CRISPR /CAS9).

Nach Herstellerangabe erfolgte die Transfektion von U937-Zellen mit dem CRISPR/Cas9-Plasmid. Die Effizienz der Transfektion wurde durch den Nachweis von grünfluoreszierender Aktivität des GFP in den transfizierten Zellen erbracht, was auf eine genomische Integration schließen lässt. Hierzu wurde das ImageStream®-Gerät genutzt.

Abschließend wurden transfizierte U937-Zellen in zwei 96-Well-Platten vereinzelt, um stabile Klone zu isolieren.

### 2.2.3 In-vitro-Cathepsin D-Verdau

Zur Untersuchung der Effekte der Protease Cathepsin D auf das native Protein *in vitro* wurde zunächst in einem Reaktionsgefäß 10 µl Natriumacetat auf Eis vorgegeben und ein für das Wirkoptimum der Protease notwendiges azides Milieu von pH 4,0 bis pH 5,0 hergestellt.

Darauffolgend wurde jeweils 1 µg rekombinanten Proteins von HSP90 beziehungsweise TCP1 alpha pro Ansatz hinzugefügt. Abschließend wurde dem Reaktionsgemisch 100 ng Cathepsin D beigegeben und der Reaktionsansatz bei 37°C für drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Der pH-Wert wurde anschließend durch titrierende Zugabe von Natriumhydroxid auf einen Wert von pH 7,0 angehoben, die Probe mit 5 µl des 5x-Lämmli-puffer versetzt und bei 95°C für 10 Minuten aufgekocht.

Bei Inhibitionsversuchen mit Cathepsin D wurde Pepstatin A jeweils einmal für 3 und dann 6 Stunden vorinkubiert. Dazu wurde 1ml einer 50 mM PepstatinA-Lösung verwendet.

Zur Visualisierung der Ergebnisse wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Zum einen für eine sich anschließende Westernblotanalyse. Zum anderen zur Färbung des Polyacrylamidgels mit Coomassie über 12 Stunden und sich anschließender massenspektrometrischer Analyse.

### 2.2.4 Immunpräzipitation

Mit dem Verfahren der Immunpräzipitation ist es möglich, ein bestimmtes Protein sowie gegebenenfalls vorhandene Bindungspartner anzureichern. Für jeden Untersuchungszeitpunkt wurden jeweils  $2 \times 10^7$  U937 Zellen abzentrifugiert und anschließend mit kaltem PBS gewaschen und für 30 Minuten bei 4° C auf Eis gekühlt.

In einem Gesamtvolumen von 200 µl wurden die Zellen nun je nach Versuch mit Fc-markiertem TNF oder nativem TNF und PBS für eine Dauer von 60 Minuten auf Eis gelagert. Darauf folgend wurde der Internalisierungsprozess bei 37 °C in einem Wasserbad gestartet und die Probe für die vorgesehene Zeitdauer inkubiert. Der Internalisierungsvorgang wurde durch kalte PBS-Zugabe und anschließende Zentrifugation bei 4°C und 250 x g gestoppt. Zum Aufschluss der Zellen der Probe wurde zum einen 1ml modifizierter RIPA-Puffer hinzugegeben und diese für 45 Minuten auf Eis gelagert. Zum anderen direkt daran anschließend das Lysat mechanisch durch eine 21 Gauge Stahlkanüle und zehnmaliges Füllen und Leeren der Spritze aufgeschlossen. Durch zehnmünütige Zentrifugation bei 14.000 x g erfolgte die Abscheidung des Zelldebris. Dem postnukleären Überstand wurde dann der für die interessierende Proteinstruktur entsprechende Antikörper mit 20 µl Protein G MicroBeads zugegeben und bei 4° C über Nacht inkubiert.

Protein G bindet dabei an den Fc-Teil des eingesetzten Antikörpers. Die paramagnetischen MicroBeads sind an das Protein G bereits konjugiert und können mit Separatoren auf µMACS-Säulen über diese Bindungskette das Protein anreichern.

Die µMACS-Säulen wurden zuerst mit 200 µl modifiziertem RIPA äquilibriert. Darauf folgte die Beladung der Säule mit dem Lysat, wobei die MicroBeads-Protein-Komplexe durch den

Magneten des Separators gebunden wurden. Im sich anschließenden Waschschrift sind unspezifische Zellkomponenten, Organellen und nichtbindende Proteine mit 1ml modifiziertem RIPA entfernt worden. Zur Elution der Proteine wurde zuerst 20 µl eines 95° C heißen 5x Lämmli-puffers für 5 Minuten auf die Säule gegeben und abschließend 45 µl des 5x Lämmli-puffers. Das Eluat wurde bei 95° C für 5 Minuten erhitzt. Für die Westernblotanalyse oder SDS-Gelelektrophorese sind jeweils 10 µl des Materials aufgetragen worden.

Modifizierter RIPA	50 mM Tris-HCl pH 7,4
	150 mM NaCl
	1 % NP-40
	0,25 % Natriumdeoxycholat
	1 % Triton X-100
	1 mM EDTA
	Protease Inhibitor Cocktail Tablets (PIC)/(Roche)

### 2.2.5 SDS-PAGE

Die SDS(*Sodiumdodecylsulfat*)-PAGE (*Polyacrylamidgelelektrophorese*) stellt ein analytisches Verfahren zur Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld dar.

Dabei kommt die Methode nach Laemmli zum Einsatz, bei der sich das Natriumdodecylsulfat (SDS) an hydrophobe Bereiche des Proteins anlagert und so für eine Linearisierung des Proteins aus einer Sekundär- oder Tertiärstruktur sorgt (Laemmli 1970). Um ein konstantes Ladungs-zu-Masse-Verhältnis zu erhalten wird die Eigenladung des Proteins durch die negativ geladenen Sulfatgruppen des SDS überlagert. Dadurch ist es nun möglich, das Proteingemisch ausschließlich entsprechend seiner molekularen Masse aufzutrennen. Die Auftrennung erfolgt in einer inerten Matrix, deren Porengröße durch Variation des Acrylamidanteils verändert werden kann.

Die Beladung des Gels erfolgte nach Proteinkonzentrationsbestimmung mit Hilfe eines BCA-Assays jeweils für 5µg Protein. Anschließend wurden jeweils 5µl des Fünffach-Laemmli-puffers zugegeben und bei 95°C für 5 Minuten gekocht. Eine Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine wird durch den Vergleich mit Proteinen eines mitaufgetragenen Molekulargewichtsmarkers möglich (Page-Ruler®). Nach Anlegung einer elektrischen Spannung beginnt nun die Auftrennung, wobei kleinere Proteine schneller durch das elektrische Feld wandern als größere. Die Elektrophorese wurde bei einem Strom von 25 mA für 70 Minuten für jeweils ein Gel betrieben.



Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

Trenngel 12,5%, ml pro Gel		Sammelgel 5 %, ml pro Gel	
40% / 2,6% Acrylamid	2,08	40% / 2,6% Acrylamid	0,3125
Trenngelpuffer	1,66	Sammelgelpuffer	0,6
ddH <sub>2</sub> O	2,85	ddH <sub>2</sub> O	1,537
10% SDS	0,08	10% SDS	0,025
10% APS	0,035	10% APS	0,025
TEMED	0,0065	TEMED	0,0025

**Tabelle 1 . Reagenzien eines Gels für die SDS –Elektrophorese**

### 2.2.6 Westernblot

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden anschließend im Tankblotverfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Zwischen zwei Filterpapieren wurde die Membran in einer Fixationskassette stabilisiert und der Tank zusätzlich mit Transblotpuffer und einer Kühleinheit versehen.

Nach Anlage einer elektrischen Spannung senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung wurden die durch SDS negativ umschlossenen Proteine im elektrischen Feld nun auf die hydrophobe PVDF-Membran übertragen. Für den Transfer wurde eine Spannung von 100 V bei einer Laufzeit von 75 Minuten angelegt. Um unspezifische Interaktionen der primären Antikörper mit der Membran zu verhindern wurde diese vor Anwendung der Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Blockingpuffer inkubiert. Zum Nachweis der zu untersuchenden

Proteine auf der Membran wurden primäre Antikörper eingesetzt, die epitopspezifisch binden sollen. Nach Ende des Blockingvorganges konnten die primären Antikörper zugegeben werden, die ebenfalls im Blockingpuffer bei 4°C über Nacht binden konnten. Gewaschen wurden die Membranen jeweils dreimal für jeweils 15 Minuten in TBST-Puffer, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Zur Darstellung der Bindung der primären Antikörper an ihre Zielproteine kamen sekundäre Antikörper zum Einsatz, die speziesspezifisch an den Fc-Teil der primären Antikörper binden.

Die HRP-konjugierten sekundären Antikörper wurden ebenfalls im Blockingpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und daran anschließend dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBST gewaschen. Durch Zugabe der Reagenzien H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Luminol aus dem ECL-Detektionsreagenz im Verhältnis 1:1 wurde eine Chemolumineszenzreaktion initiiert, die auf einem entwickelten Röntgenfilm sichtbar gemacht werden konnte.

<b>Transblotpuffer</b>	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)
<b>Blockingpuffer</b>	Magermilchpulver	5 % (v/v)
	TBST – Puffer 1x	
<b>TBST-Puffer</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,5,	
	150 mM NaCl	
	0,1 % Twen 20	

### 2.2.7 Immunfluoreszenzanalyse

Zur immunfluoreszenzanalytischen Untersuchung möglicher Kolokalisationen der zu untersuchenden Proteine sind adhärenzte HeLa-Zellen verwendet worden. Dazu wurden in einer 6-Well-Schale jeweils 3 ml DMEM-Medium mit  $2,0 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz auf Fibronectin beschichtete Deckgläschen ausgesät. Über Nacht wurde der Ansatz bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank inkubiert.

Im nächsten Schritt ist der Ansatz 30 Minuten auf Eis gekühlt und das DMEM-Medium durch 3 ml kaltes PBS ersetzt worden. Darauffolgend schloss sich die Stimulation mit Fc-TNF an, wofür die zellbesetzte Seite des Deckgläschens mit dem Fc-TNF und 1 % BSA in PBS benetzt wurde. Anschließend wurde der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert und danach mit 3 ml PBS in der 6-Well-Schale gewaschen.

Die Internalisierung erfolgte in einem separaten Well mit 3 ml vorgewärmtem DMEM-Medium für die vordefinierten Zeitpunkte bei 37° C. Mit kaltem PBS wurde der Internalisierungsvorgang beendet. Um die Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen zu gewährleisten wurde jedem Well 2 ml 4 % Formaldehyd in PBS für 40 Minuten zugesetzt und der Reaktionsansatz dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Zur Erleichterung der Bindung der primären Antikörper an ihre Epitope wurden die Zellen mit 0,2 % Saponin und 0,1 % BSA permeabilisiert. Die primären Antikörper wurden dann in einer 1:100 Verdünnung in 100 µl PBS zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS konnten dann die Fluorophor-konjugierten sekundären Antikörper in einer 1:200 Verdünnung hinzugefügt werden und ebenfalls für eine Stunde binden. Nach zweimaligem Waschen mit PBS schloss sich eine Fixierung auf dem Objektträger durch Zugabe des Fixierungsmediums ProLongGold mit DAPI an. Die Präparate wurden abschließend für 24 Stunden unter Raumtemperaturbedingungen getrocknet und anschließend mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop untersucht.

#### Primäre Antikörper

ZDHHC20 (N-15) rabbit polyclonal IgG sc-84667

ZDHHC21 (E-17) goat polyclonal IgG sc-249404

#### Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor® 555 Donkey Anti-Rabbit IgG

Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Goat IgG

Alexa Fluor® 647 Donkey Anti-Human IgG Fc

### 2.2.8 Massenspektrometrie (ATOMS)

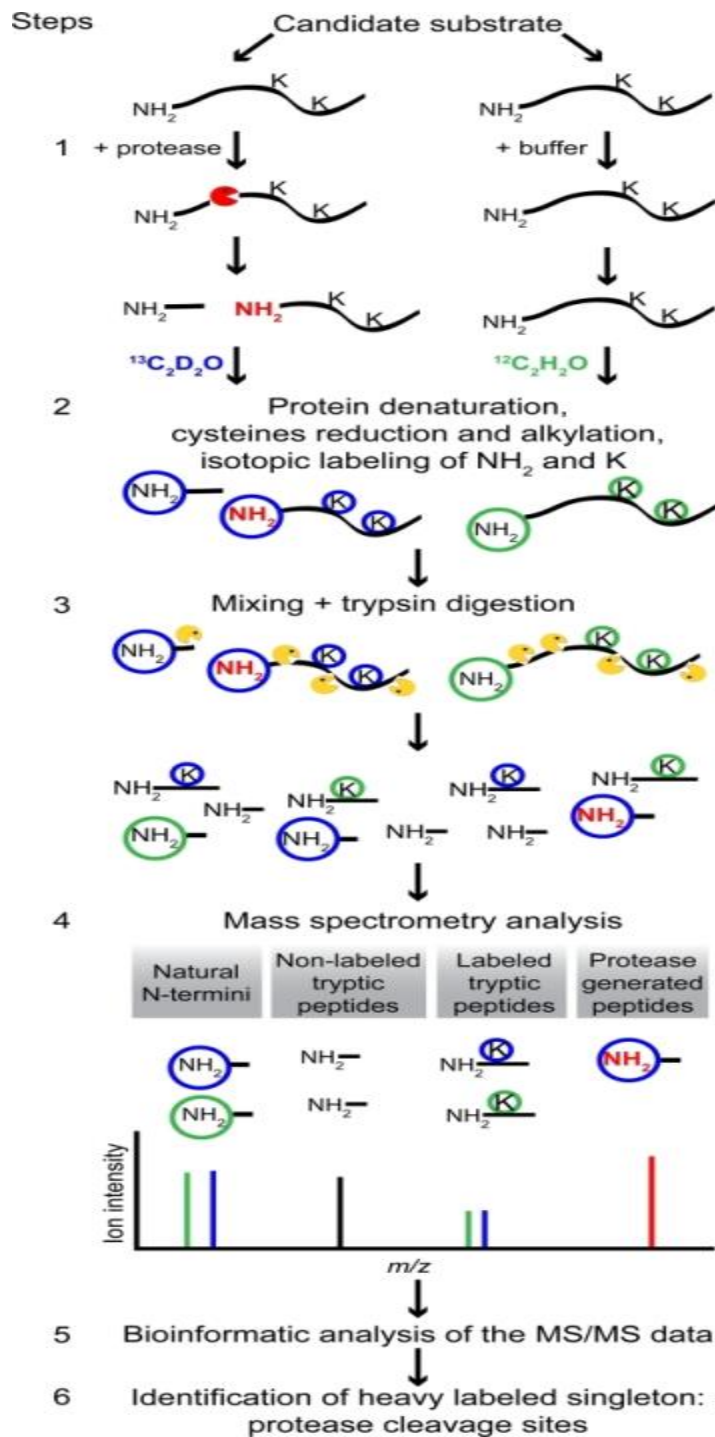
Zur Charakterisierung der durch die Proteasereaktion entstandenen Schnittstellen und Spaltungsprodukte wurde ein massenspektrometrisches Verfahren angewendet. Die Messungen und Aufbereitungen der Ergebnisse wurden in Kooperation mit Prof. Andreas Tholey vom Institut für Experimentelle Medizin an der Universität Kiel durchgeführt. Hierbei kam ein modifiziertes Verfahren der etablierten Flüssigkeitschromatographie gekoppelten Massenspektrometrie (LC-MS) zur Anwendung.

Doucet und Overall (Doucet und Overall, 2011) beschrieben dieses Verfahren und publizierten es unter dem Akronym ATOMS (**A**minoterminal **o**rientierte **M**assenspektrometrie von **S**ubstraten). Im Gegensatz zum herkömmlichen Verfahren, bei dem auf einem gefärbten SDS-PAGE-Gel das interessierende Protein fixiert ist, entfällt hier dieser Schritt. Das ATOMS-Verfahren nutzt in Lösung befindliche Substrate.

Nachfolgend wird das Verfahren schrittweise anhand der Abbildung 2-2 näher beschrieben, wobei jedoch nur auf Abweichungen zum etablierten Verfahren detailliert eingegangen wird.

Die zu untersuchende Protease wird im ersten Schritt mit dem zu untersuchenden Substrat inkubiert. Dabei entstehen sogenannte Neo-N-Termini. Als Kontrolle diene reines Protein in einem Puffer. Der zweite Schritt sieht vor, dass die Proteine denaturiert und Cysteinreste alkyliert werden. Alle N-Termini und Lysinseitenketten in der Proteasefraktion werden mit schwerem Formaldehyd (blaue Umkreisung) oder leichtem Formaldehyd (grüne Umkreisung) in der Kontrollfraktion markiert. Anschließend werden in einem dritten Schritt beide Proben miteinander vermischt und durch die Zugabe der Serinprotease Trypsin hinter Argininresten gespalten. Die so aufbereiteten Proben können der massenspektrometrischen Analyse zugeführt werden. Im Ergebnis lassen sich durch diese Vorgehensweise vier Fraktionen massenspektrometrisch unterscheiden. Zum einen markierte und nicht markierte trypsinisierte Peptide. Zum anderen die natürlichen und die durch die Protease generierten Neo-N-Termini.

Durch einen Datenbankabgleich kann die Position des proteasegenerierten Neo-N-Terminus in Bezug auf das Gesamtlängenprotein dargestellt werden und so die spezifische Spaltungsstelle identifiziert werden.



**Abbildung 2-2. ATOMS-Protokoll.** Modifiziert entnommen aus Doucet und Overall, 2011. Erläuterung und Kommentierungen siehe obigen Text. **Abkürzungen:** K: Lysin-Seitenketten; <sup>13</sup>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>O: schweres Formaldehyd; <sup>13</sup>C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O: leichtes Formaldehyd.

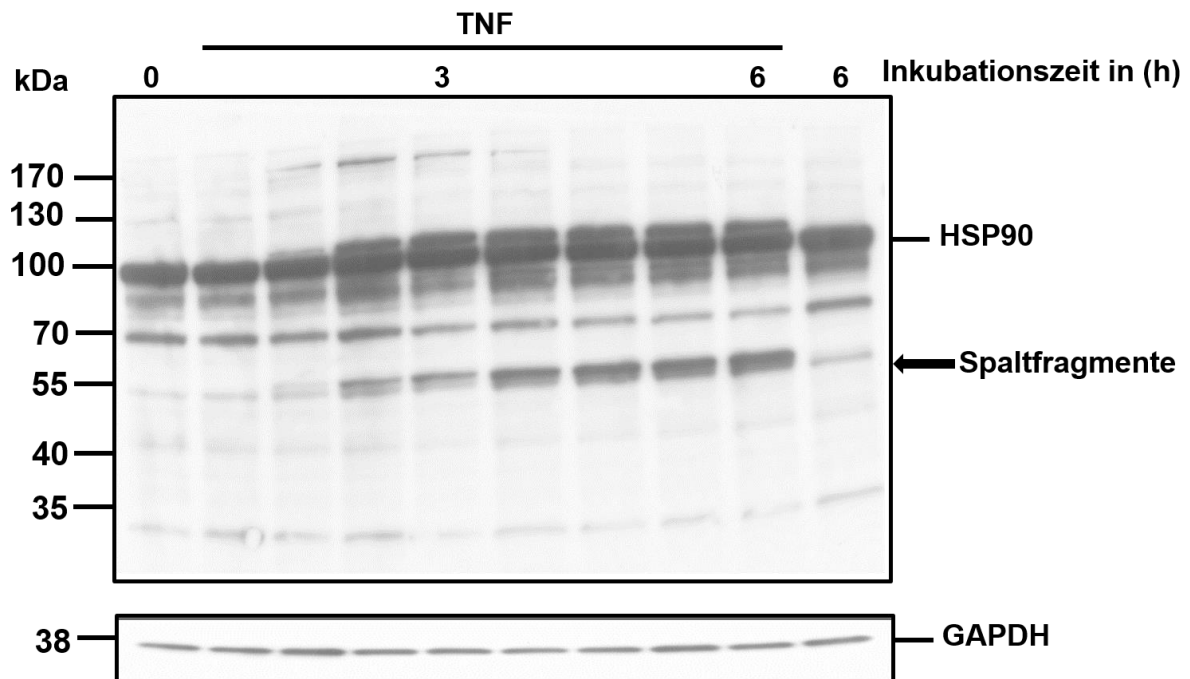
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 HSP90

##### 3.1.1 TNF induzierte Spaltung von HSP90 durch CTSD

Ausgehend von den Voruntersuchungen aus der 2D-DIGE sollte untersucht werden, ob die Spaltung von HSP90 durch CTSD über eine Stimulation der Zelle mit exogenem TNF induzierbar ist.

Hierfür wurden U937-Zellen in einem Gesamtzeitrahmen von sechs Stunden mit TNF stimuliert, wobei alle 45 Minuten ein Untersuchungszeitpunkt markiert wurde. Abbildung 3-1 zeigt neben dem Erscheinen des spezifischen Bandenmusters von HSP90 bei 90 kDa das Auftauchen neuer Bandenmuster deutlich nach circa 135 Minuten im Bereich von 45 kDa bis 55 kDa, die als Spaltfragmente angesehen werden.



**Abbildung 3-1. Entstehung von Spaltfragmenten nach TNF Stimulation.** In einem Zeitrahmen von insgesamt 6 Stunden erscheinen nach 135 Minuten TNF-Stimulation Spaltfragmente zwischen 40 kDa und 55 kDa (Cell Signalling Antikörper #4874). Ein GAPDH-Reblot dient zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung.

Die Hauptform bei 90 kDa wird durch den Antikörper erkannt und beschreibt Isoformen, die nicht durch proteolytische Spaltung betroffen sind. Die zeitgleich sichtbare Bande bei 110 kDa korreliert mit dem Auftreten eines schwachen Bandenmusters bei 180 kDa.

Um den Nachweis zu führen, dass die Entstehung der Fragmente auf eine Spaltung von HSP90 durch die Aspartatprotease Cathepsin D zurückzuführen sein könnte, wurde in wiederholenden Experimenten der Aspartatproteaseinhibitor Pepstatin A eingesetzt. Dieser sollte die Wirkung des Cathepsin D reduzieren oder aufheben und damit die proteolytische Spaltung beeinflussen. Dazu wurden die U937 Zellen 8 Stunden mit Pepstatin A vorinkubiert, um eine optimale Penetranz der Substanz in die Zelle zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen jeweils insgesamt sechs Stunden mit TNF allein und TNF mit Pepstatin A zusammen inkubiert. Zu zwei definierten Zeitpunkten (vier und sechs Stunden) wurden Proben ausgewählt, zu denen das Aufkommen der Spaltfragmente sicher nachgewiesen worden ist.

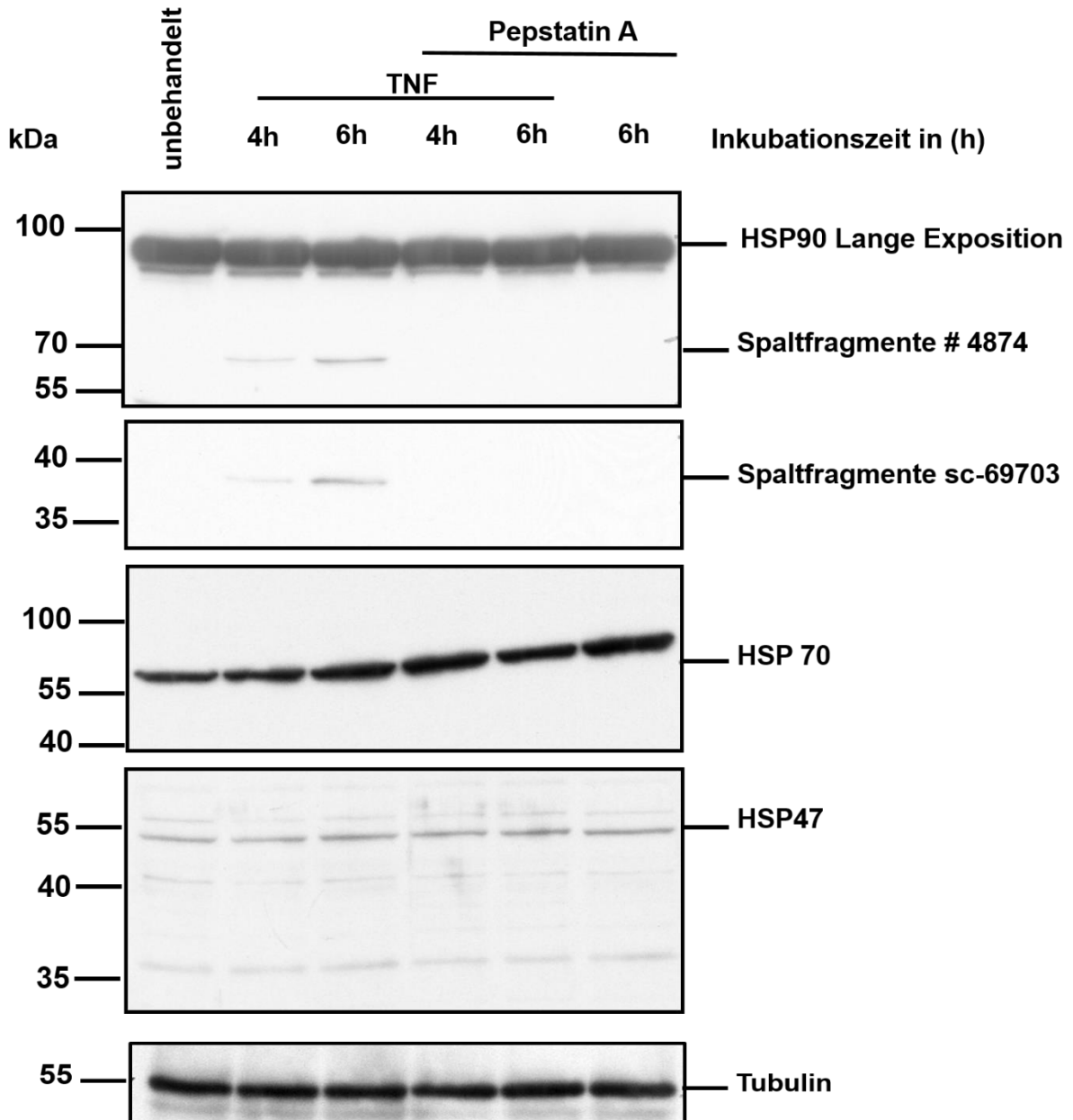
Abbildung 3-2 zeigt Westernblots dieses Experimentes. Zu erkennen ist bei einer hohen Expositionsdauer von über einer Stunde das Aufkommen von Spaltfragmenten zwischen 55 kDa und 70 kDa mit dem Antikörper von cell signalling (#4847). Zum anderen visualisiert der eingesetzte Antikörper der Firma Santacruz (sc-69703) Spaltfragmente zwischen 35 kDa und 40 kDa.

In der mit Pepstatin A behandelten Fraktion sind diese Fragmente nicht erkennbar. Ein Entstehen von Spaltfragmenten konnte bei den potentiellen Interaktionspartnern HSP70 und HSP47, die ebenso wie HSP90 aus der Familie der Hitzeschockproteine stammen, nicht nachgewiesen werden.

Für den Nachweis, dass HSP90 direkt von Cathepsin D gespalten werden kann und dabei distinkte Spaltfragmente entstehen, wurde rekombinantes HSP90 für eine Stunde bei einem pH von 5.0 und 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine SDS-PAGE, der sich zum einen ein Westernblot anschloss. Zum anderen erfolgte eine Färbung des Gels mit Coomassie zur weiteren massenspektrometrischen Analyse.

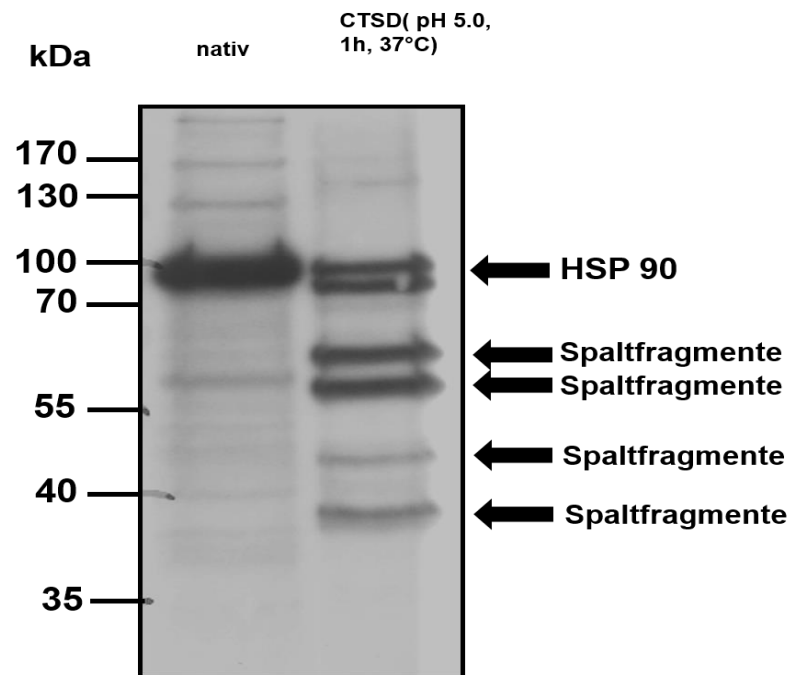
Abbildung 3-3 zeigt neben dem nativen HSP90-Protein das Entstehen von Spaltfragmenten in der mit humanem Leber-CTSD behandelten Fraktion zwischen 35 kDa bis 60 kDa.

Mit dem Verfahren der Immunpräzipitation wurde anschließend zum einen das native Protein selbst untersucht und zum anderen, ob Spaltfragmente von HSP90 anzureichern sind. Abbildung 3-4 zeigt dabei das Ergebnis mehrmals wiederholter Versuche. Nach TNF-Stimulation findet sich nicht das zu erwartende Aufkommen der spezifischen Bandenmuster zwischen 45 kDa und 55 kDa, wie es in Abbildung 3-1 beschrieben worden ist. Auch bei längeren Belichtungszeiten ließen sich keine spezifischen Bandenmuster im Westernblot visualisieren. Eine Anreicherung der Spaltfragmente konnte mit dem Verfahren der Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden.

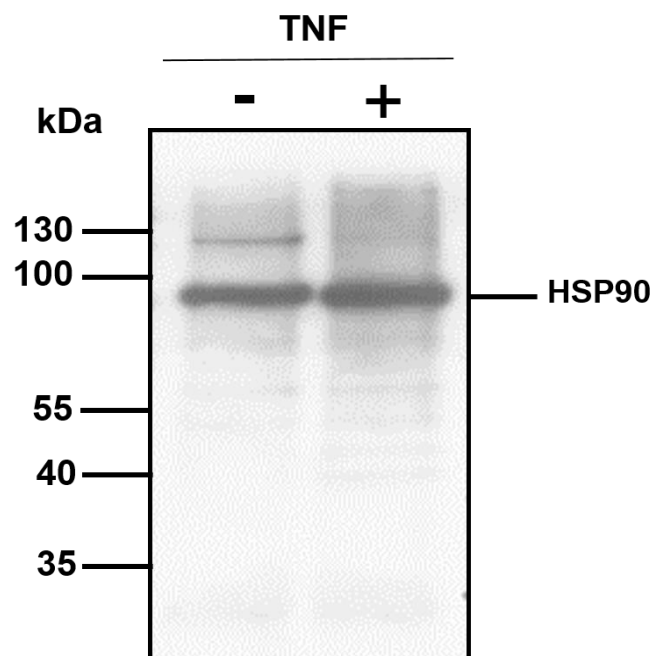


**Abbildung 3-2. Entstehung von Spaltfragmenten und deren Inhibition.** Dargestellt in diesem Westernblot sind in der oberen Hälfte zum einen das Entstehen von Spaltfragmenten unter TNF-Stimulation und deren Inhibition bei zur TNF-Stimulation gleichzeitig erfolgter Blockade der Proteaseaktivität durch Pepstatin A. Zur Visualisierung wurden zwei unterschiedliche Antikörper eingesetzt. HSP70 und HSP47 zeigen als Kontrollvergleich kein Aufkommen von Spaltfragmenten. Als Beladungskontrolle dient ein Tubulin-Reblot.





**Abbildung 3-3. Inkubation von HSP90 mit Cathepsin D.** Im Westernblot ist auf der linken Seite das native Protein dargestellt. Rechtsseitig erscheinen distinkte Spaltfragmente nach Inkubation mit humanem Cathepsin D zwischen 35 kDa und 65 kDa.



**Abbildung 3-4. Immunpräzipitation von HSP90.** U937-Zellen wurden für drei Stunden ohne und mit TNF stimuliert inkubiert. Ein Auftreten von Spaltfragmenten ist nicht zu erkennen. Lediglich das native Protein bei 90 kDa ist nachweisbar.

### 3.1.2 Kolokalisation von HSP90 und Cathepsin D

Mit dem Verfahren der Immunfluoreszenz ist es möglich, über eine räumliche Auflösung die Nähe einzelner fluoreszenzmarkierter Proteine oder Strukturen zueinander zu visualisieren. Hierzu wurde für Cathepsin D und HSP90 untersucht, ob eine Kolokalisation besteht, die auf eine mögliche temporospatiale Interaktion beider Strukturen rückzuschließen erlauben könnte.

Dazu wurden HeLa-Zellen für eine Stunde nach Protokoll mit TNF stimuliert, fixiert und unter dem Laserscanning-Mikroskop analysiert. Cathepsin D (488 nm) ist in Ausschnitt (A) der Abbildung 3-5 dabei insgesamt eher perinukleär, mit vereinzelt loci an der Plasmamembran verteilt, wohingegen HSP90 (555 nm) in (B) panzytosolisch anzutreffen zu sein scheint. Deutlich zu erkennen ist, dass Cathepsin D und HSP90 zu dieser Zeit bereits teilweise kolokalisieren. Dies ist in Ausschnitt (D) an der Überlagerung beider Signale zum gelben Signal feststellbar. Die DAPI-Kernfärbung erscheint in (C) in blauer Färbung.

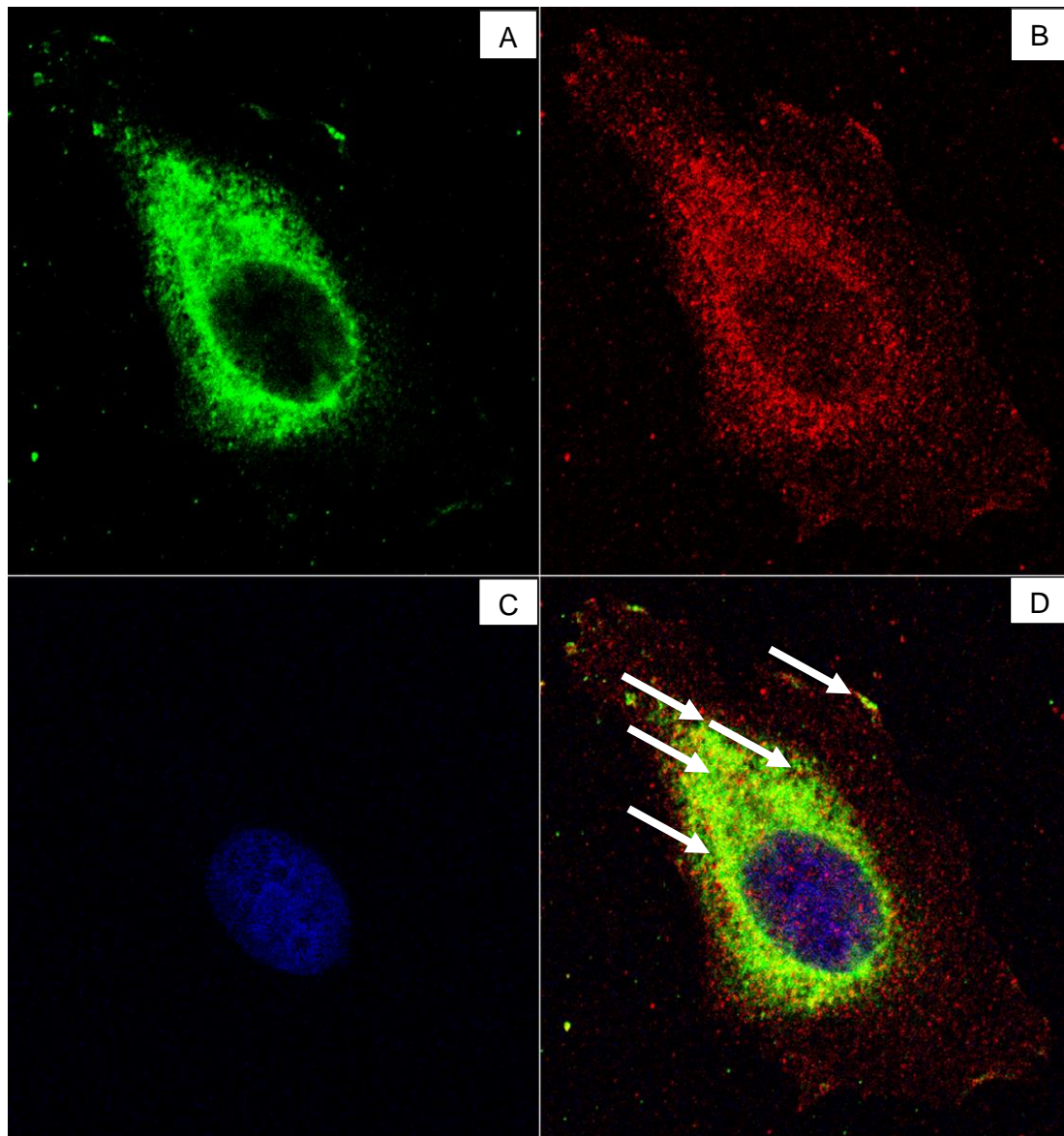
### 3.1.3 Massenspektrometrische Charakterisierung der HSP90 Spaltfragmente

Um die durch proteolytische Spaltung von Cathepsin D an HSP90 erzeugten Schnittstellen näher zu charakterisieren, wurden Proben aus den In-vitro-Experimenten durch eine massenspektrometrische Analyse genauer untersucht.

Dazu wurde das Protein in Lösung mit der Protease Cathepsin D dem ATOMS-Verfahren unterzogen, einer modifizierten Form der Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC MS/MS). Abbildung 3-6 fasst tabellarisch die ermittelten Spaltungsstellen von Cathepsin D an HSP90, die sich hauptsächlich auf zwei Domänen verteilen, für zwei unabhängige Messungen zusammen.

Das Gesamtprotein HSP90 umfasst 732 Aminosäuren, wobei der N-Terminus die Aminosäuren 1 bis 275, die Mitteldomäne die Aminosäuren 276 bis 444 und der C-Terminus die Aminosäuren 445 bis 732 enthält. Die im N-Terminus lokalisierten Spaltungsstellen variieren nur minimal voneinander, oftmals nur um eine einzelne Aminosäure (aa 45-60, aa 46-60), wohingegen im C-Terminus und der mittleren Domäne distinktere Fragmente entstehen.

Abbildung 3-7 zeigt hierzu die Verteilung der Schnittstellen und die Neoproteine als rote Markierung in der aufgeführten Primärstruktur von HSP90. Im Vergleich zu den in den Westernblots dargestellten Spaltfragmenten zwischen jeweils 40 kDa und 60 kDa korrelieren dazu potentielle Schnittstellen bei Phenylalanin in Position 437 oder Tyrosin in Position 465.



**Abbildung 3-5. Kolokalisation von Cathepsin D und HSP90.** Aufgeführt sind die einzelnen strukturspezifischen Immunfluoreszenzfärbungen in (A) Cathepsin D in grün, (B) HSP90 in rot, (C) Kernfärbung in blau und (D) Kolokalisation zwischen CTSD und HSP90 in gelb, verdeutlicht durch die weißen Markierungspfeile.

Start	End	Sequence	BR1			BR2		
			PSMs	Quan Count	Average	PSMs	Quan Count	Average
38	46	YSNKEIFLR	6	3	100	4	3	100
45	60	LRELISNSSDALDKIR	33	9	100	33	9	100
45	60	LRELISNSSDALDKIR*	9	3	100	14	5	100
46	60	RELISNSSDALDKIR	33	9	100	34	9	100
46	60	RELISNSSDALDKIR*	33	9	100	30	9	93.2
48	60	LISNSSDALDKIR	12	3	100	22	7	87.4
49	60	ISNSSDALDKIR	24	6	100	23	6	100
49	60	ISNSSDALDKIR*	12	5	100	15	6	100
77	87	HINLIPNKQDR	6	3	97.8	11	3	14.0
385	400	IRGVVDSIDLPLNISR*	14	4	100	19	6	100
388	401	VVDSIDLPLNISRE*	19	6	100	12	3	100
438	456	YEQFSKNIKLGIEDSQNR	11	3	100	11	6	75.9
466	483	YTSASGDEMVSLEKDYCTR	3	2	100	10	3	100
677	687	SLEDPQTHANR	16	4	94.5	6	2	31.0

**Abbildung 3-6. Charakterisierung der proteolytischen Schnittstellen.** Gekennzeichnet sind der jeweilige Start- und Endpunkt des durch die Protease verursachten Spaltungsfragmentes bezogen auf die Primärstruktur des HSP90-Proteins für zwei unabhängige Messungen.

MPEETQTQDQ PMEEEEVETF AFQAEIAQLM SLIINTF **YSN KEIF LREL IS**  
**NSSDALDKIR** YESLTDPSKL DSGKEL **HINLIPNKQDR**TLT IVDTGIGMTK  
 ADLINNLGTI AKSGTKAFME ALQAGADISM IGQFGVGFYS AYLVAEKVTV  
 ITKHNDDEQY AWESSAGGSF TVRTDTGEPM GRGTVILHL KEDQTEYLEE  
 RRIKEIVKKH SQFIGYPITL FVEKERDKEV SDDEAEEKED KEEEEKEEEK  
 ESEDKPEIED VGSDEEEEEKK DGDKKKKKKI KEKYIDQEEL NTKPIWTRN  
 PDDITNEEYG EFYKSLTNDW EDHLAVKHFS VEGQLEFRAL LFVPRRAPFD  
 LFENRKKKNN IKLYVRRVFI MDNCEELIPE YLNF **IRG VVD SEDLPLNISR**  
**EMLQQSKILK** VIRKNLVKKC LELFTELAED KENYKKF **YEQ FSKNIKLGIIH**  
**EDSQNR**KKLS ELLRY **YTSAS GDEMVSLEKDY CTR**MKENQKH IYYITGETKD  
 QVANSFAVER LRKHGLEVIY MIEPIDEYCV QQLKEFEGKT LVSVTKEGLE  
 LPDEEEEEKK QEEKKTKFEN LCKIMKDILE KKVEKVVVSN RLVTSPPCIV  
 TSTYGWTANM ERIMKAQALR DNSTMGYMAA KKHLEINPDH SIETLRQKA  
 EADKNDKSVK DLVILLYETA LLSSGF **SLED PQTHANRIYR** MIKLGIGIDE

**Abbildung 3-7. Aminosäuresequenz von HSP90 mit CTSD Spaltungsstellen.** Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von HSP90. In roter Farbe die durch ATOMS identifizierten Peptide.

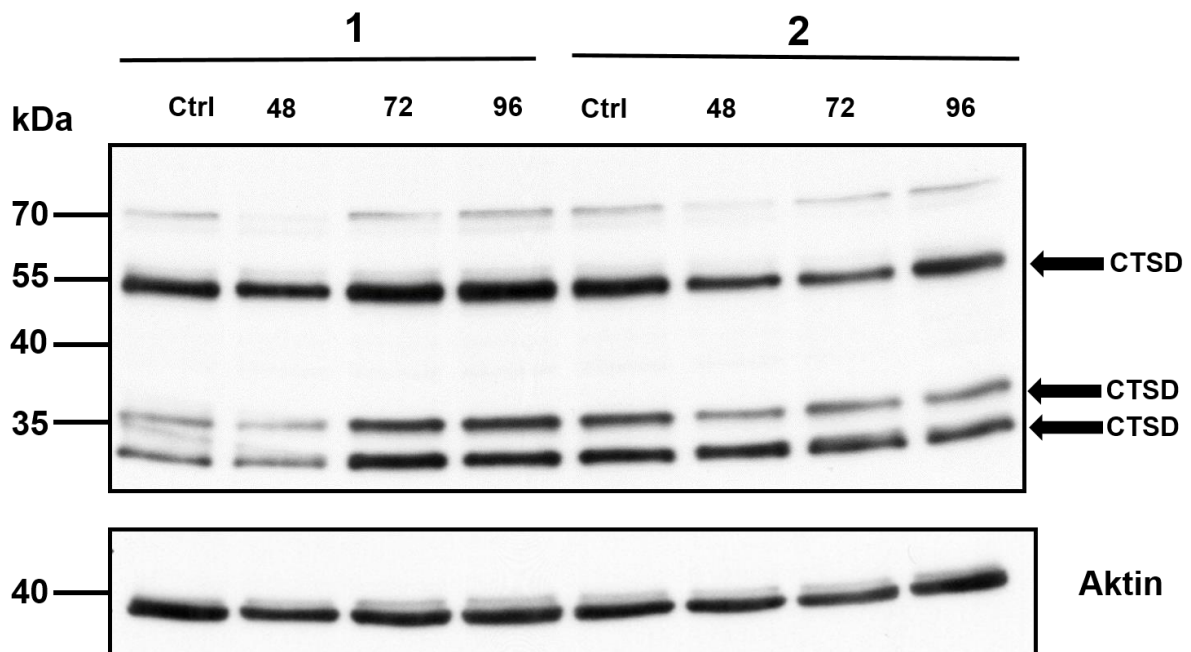
### 3.1.4 Herunterregulation der CTSD-Proteinexpression durch RNAi und CRISPR/Cas9

Da der Aspartatproteaseinhibitor Pepstatin A nicht spezifisch nur Cathepsin D inhibiert, sollte untersucht werden, ob nach Herunterregulation der CTSD-Proteinexpression *in vivo* nach TNF-Stimulation eine Spaltung von HSP90 noch stattfinden kann.

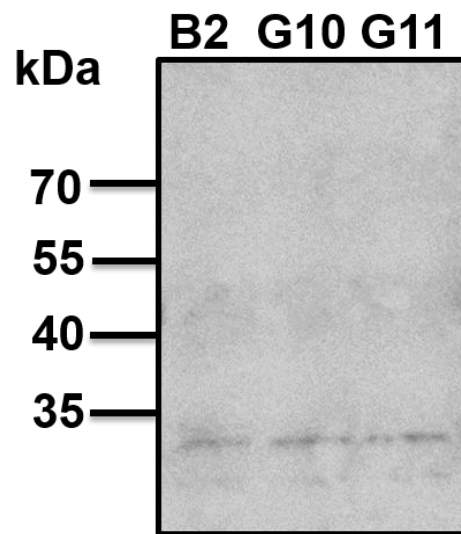
Mit dem gentechnischen Verfahren der *small interfering* RNA (siRNA) wurden U937-Zellen transfiziert und der Erfolg über einen CTSD-Nachweis im Westernblot für zwei Klone erbracht. In Abbildung 3-8 sind in beiden Klonen neben der maturen Proform bei 52 kDa auch die aktive *heavy chain* bei 34 kDa und die *light chain* bei 14 kDa nachweisbar. Eine signifikante und stabile Inhibition der Proteinexpression in U937-Zellen ist mit der Methode der siRNA leider nicht erfolgreich gewesen.

Da U937-Zellen in der Literatur als schwer zu transfizierende Zellen beschrieben wurden (Tietz et al., 2012), ist in einem Parallelversuch ein experimenteller Ansatz mit *small hairpin* RNA (shRNA) durchgeführt worden. Dabei konnten drei stabile Klone B2, G10 und G11 gewonnen werden.

In Abbildung 3-9 ist bei einer Belichtungszeit von 60 Minuten kein signifikanter Nachweis einer Cathepsin D-Aktivität im Westernblot darstellbar. Die mature 52 kDa Form ist nicht erkennbar. *Heavy chain* und *light chain* nur äußerst schwach.

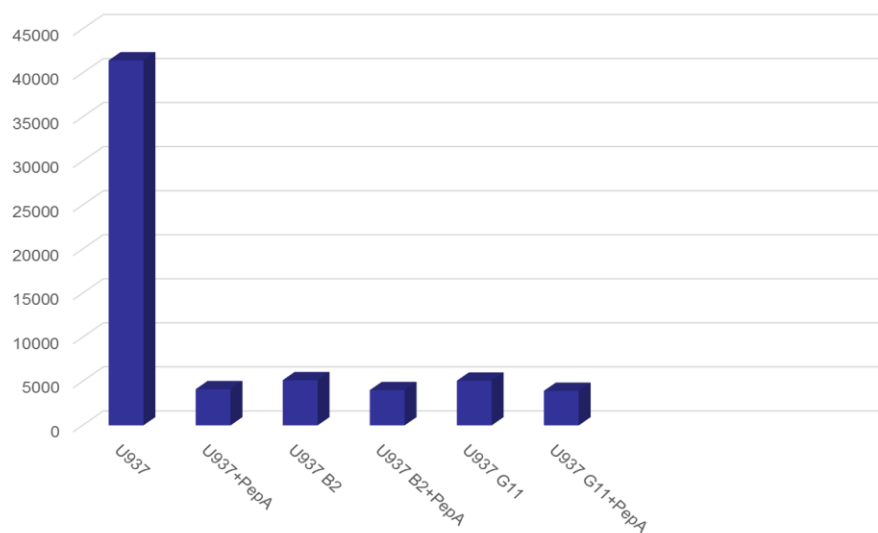


**Abbildung 3-8. CTSD Herunterregulation durch siRNA.** Bei 55 kDa erscheint die mature Proform von CTSD. Die aktiven Formen sind bei 34 kDa und 14 kDa ebenfalls in beiden Klonen nach 48 h schwach und nach 96 h deutlicher zu erkennen. Zur Beladungskontrolle dient Aktin im Reblot.



**Abbildung 3-9. Herunterregulation der CTSD-Proteinexpression durch shRNA.** Dargestellt sind die durch shRNA erzeugten Klone B2, G10, und G11. In einem Westernblot bei 60 Minuten Belichtungszeit wurde ein Antikörper gegen Cathepsin D gerichtet eingesetzt. Es erscheinen keine Bandenmuster an zu erwartender Lokalisation.

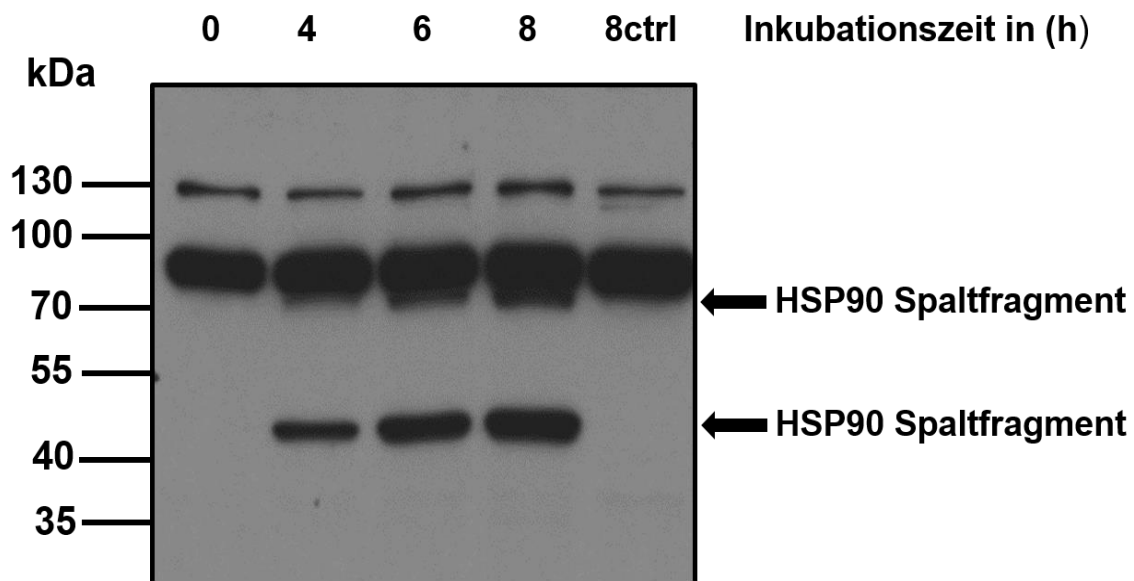
CTSD Aktivität



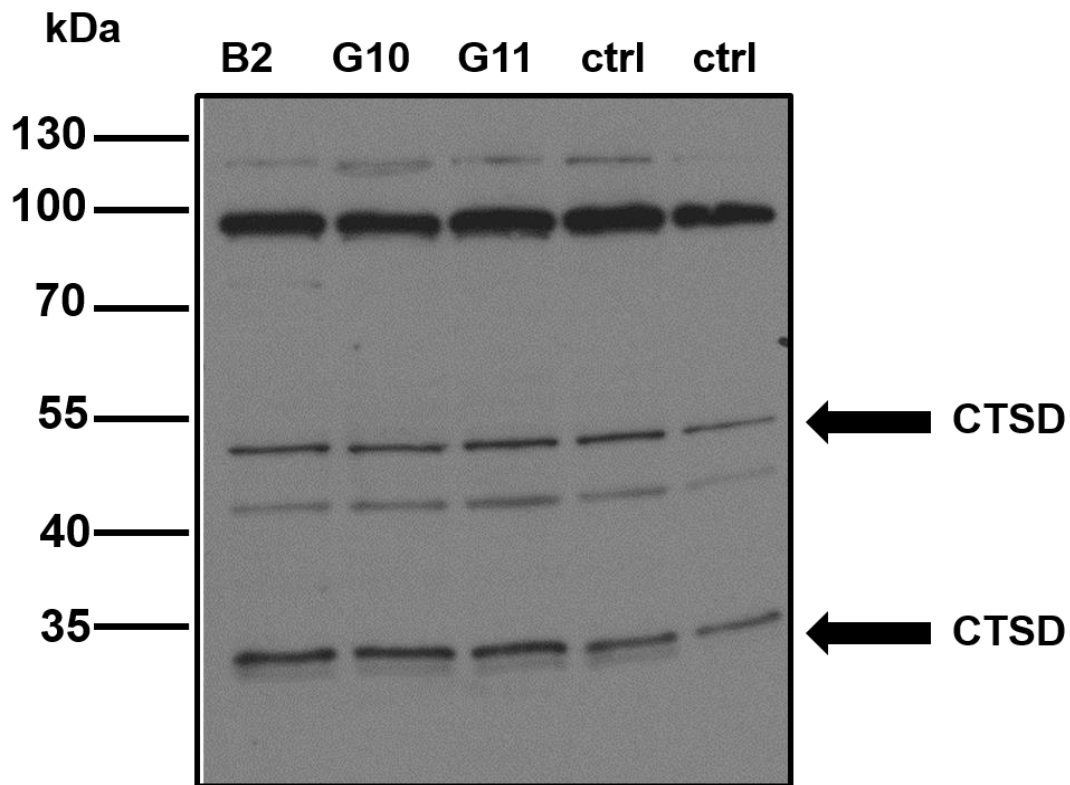
**Abbildung 3-10. CTSD-Aktivitätsassay.** Untransfizierten U937-Zellen mit und ohne Pepstatin A sind die Klone B2 und G11 jeweils mit und ohne Pepstatin A gegenüber gestellt. Die Cathepsin D-Aktivität ist zum Grundniveau hin deutlich reduziert. Am Tabellenrand links sind dimensionslose CTSD-Enzymaktivitätseinheiten aufgetragen.

Ein zur Erfolgskontrolle der Transfektion durchgeführter Cathepsin D-Aktivitätsassay zeigt in Abbildung 3-10 für die Klone B2 und G11 eine deutliche Reduktion der Cathepsin D-Aktivität. Dieser Assay wurde 10 Stunden nach Transfektion der U937-Zellen durchgeführt. Durch Hinzufügen von Pepstatin A konnte in den Klonen die Cathepsin D-Aktivität noch weiter reduziert werden. Eine vollständige Inhibition gelang nicht.

Die Klone B2 und G11 wurden in RPMI-Medium kultiviert und anschließend für insgesamt 8 Stunden mit TNF stimuliert, um zu untersuchen, ob das Auftreten der HSP90-Spaltfragmente beobachtet werden kann. Abbildung 3-11 zeigt in einem Westernblot das Auftreten der Spaltfragmente zwischen 40 kDa und 60 kDa nach TNF-Stimulation bei einstündiger Belichtungszeit exemplarisch im Klon G11 24 Stunden nach Transfektion. Eine Herunterregulation der Cathepsin D-Aktivität ist, im Gegensatz zu den Befunden, die der Aktivitätsassay erbrachte, durch dieses Experiment mit Visualisierung im Westernblot nicht erfolgt. Diese Tatsache wird auch durch den Nachweis der Cathepsin D-Proteinexpression durch einen spezifischen Antikörper in Abbildung 3-12 gezeigt. Für die Klone B2, G10 und G11 ist dort das Auftreten der unterschiedlichen Formen des Cathepsin D dokumentiert.



**Abbildung 3-11. HSP90 Spaltfragmente im G11 Klon.** Nach insgesamt achtstündiger Stimulation des G11 Klon mit TNF zeigt sich nach vier Stunden das Auftreten der auch in untransfizierten U937-Zellen beobachteten Spaltfragmente.



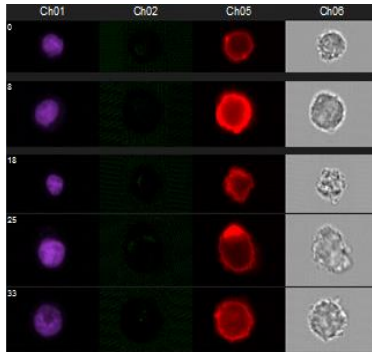
**Abbildung 3-12. Nachweis von CTSD-Aktivität in den Zellklonen.** Für die mit shRNA erzeugten Klone B2, G10 und G11 ist in diesem Blot eine Expression des Cathepsin D-Proteins durch einen spezifischen Antikörper im Westernblot dokumentiert.

Für eine stabile Inhibition der Cathepsin D-Proteinexpression kam nach den shRNA-Experimenten die CRISPR/Cas9-Methode zur Anwendung. Hierzu wurde ein GFP-gekoppeltes Plasmid benutzt, dessen genomische Integration durch eine optische Kontrolle mit dem ImageStream® mkII überprüft wurde. Diese Messung besteht aus einer Kombination aus Durchflussszytometer und sehr schneller hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie und wurde von Dr. Jürgen Fritsch am Institut für Immunologie durchgeführt.

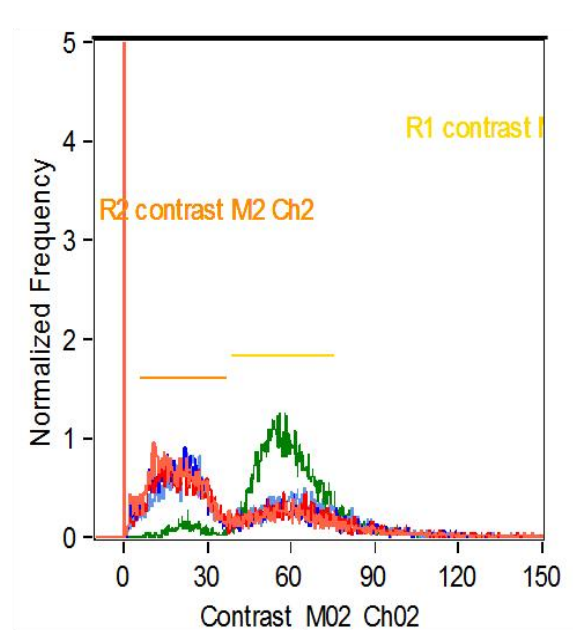
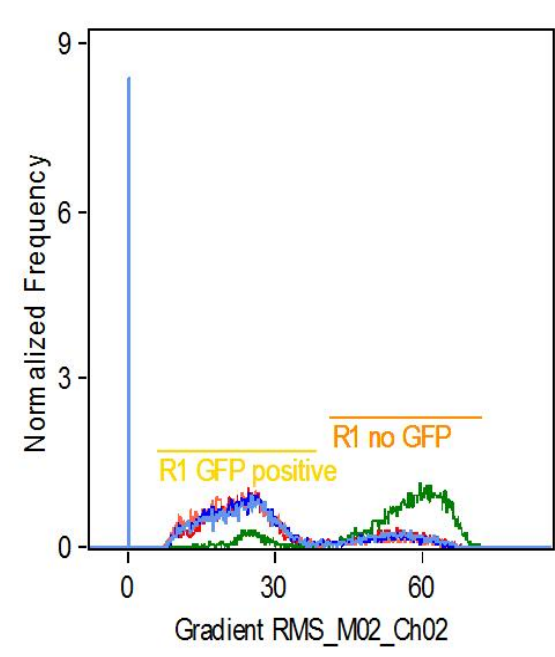
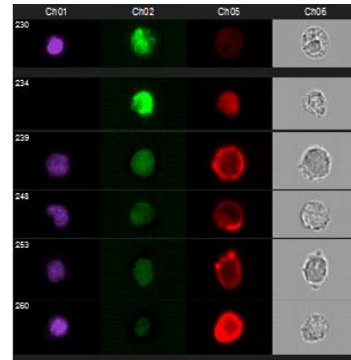
Abbildung 3-13 zeigt die Ergebnisse für dieses Experiment an. In (A) ist der Zustand 24 Stunden nach Transfektion dargestellt. Im Kanal 2 (Ch02) erscheint ein schwach detektierbares Fluoreszenzmuster, das graphisch als R1-GFP-positive Zelle durch den gelben Querstrich markiert ist. In (B) hat sich 48 Stunden nach Transfektion der Anteil der GFP-positiven Zellen erhöht, die nun ein Fluoreszenzmuster aufweisen. Dies gilt als Hinweis darauf, dass das Plasmid genomisch integriert worden ist. Das Vereinzeln der transfizierten Zellklone war bis Drucklegung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen.



**A**



**B**

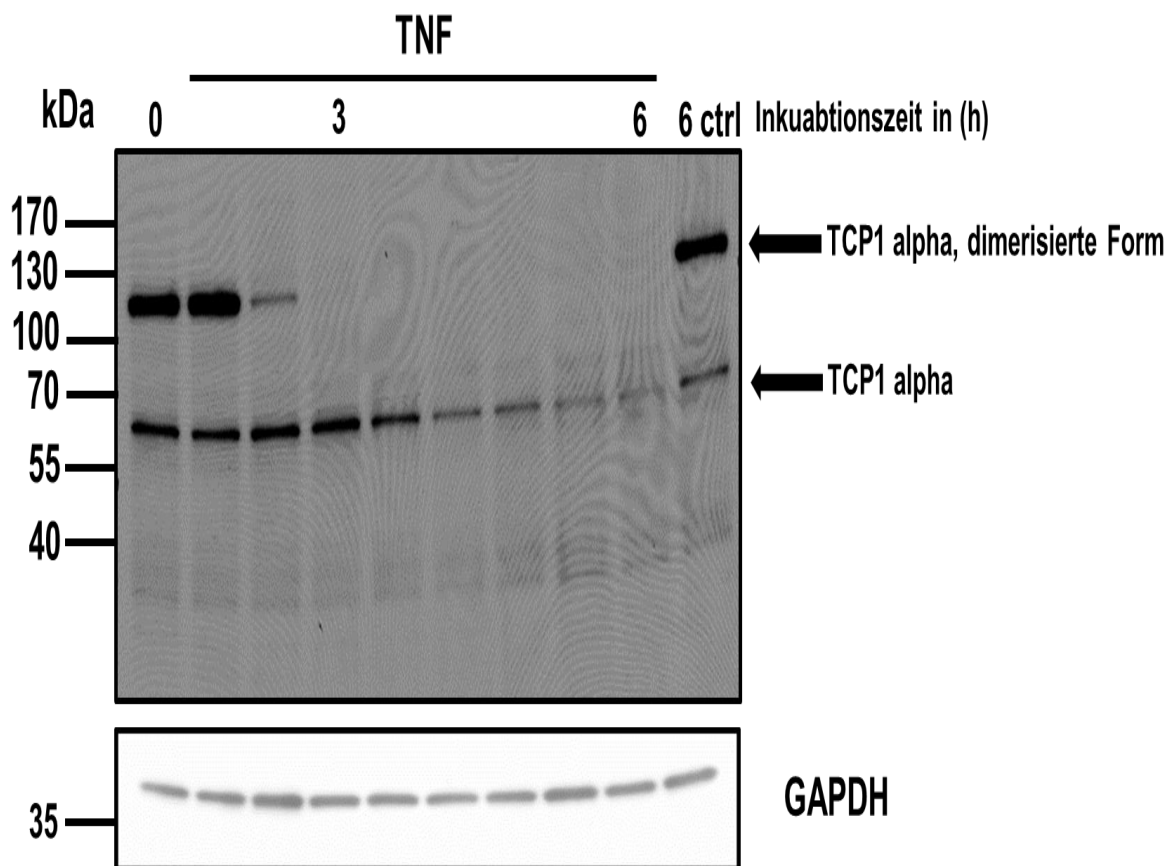


**Abbildung 3-13. Transfektion von U937-Zellen mit einem GFP-CRISPR/Cas9-Plasmid.** In **(A)** zeigen sich die U937-Zellen 24 Stunden nach Transfektion. Der Anteil GFP-negativer Zellen überwiegt (oranger Querstrich R1). Teilbild **(B)** beschreibt den Zustand 48 Stunden nach Transfektion mit deutlich erhöhtem Anteil GFP-positiver Zellen, die ein Fluoreszenzmuster im Kanal 2 anzeigen.

## 3.2 Substrat TCP1 alpha/TRiC

### 3.2.1 TNF stimulierte Degradation von TCP1 alpha

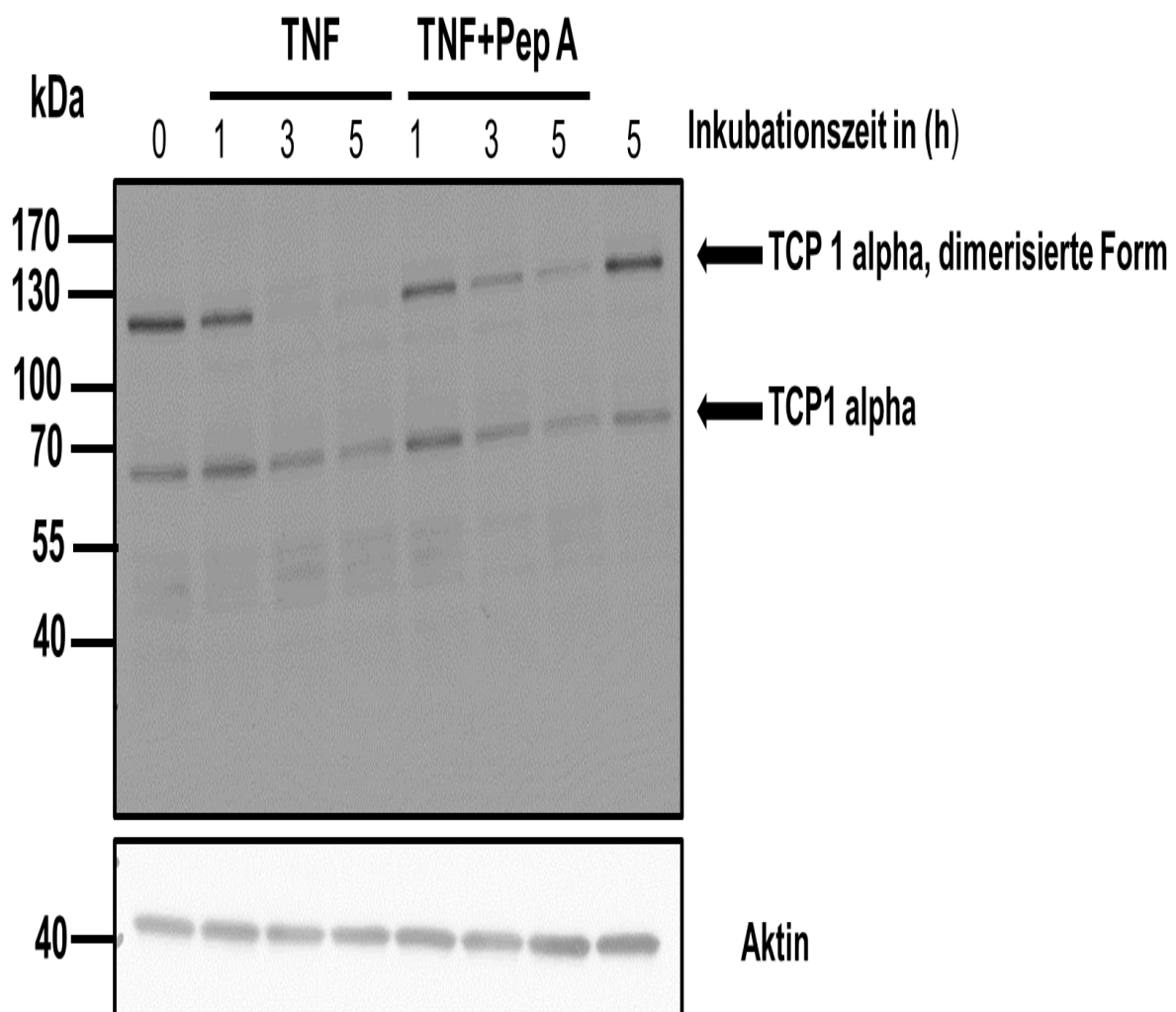
Zu Beginn sollte untersucht werden, ob durch TNF-Stimulation in U937-Zellen eine proteolytische Degradation herbeigeführt werden kann. Dazu wurden U937-Zellen nach Protokoll für mehrere Versuchswiederholungen insgesamt sechs Stunden mit TNF stimuliert. Zu definierten Zeitabständen erfolgte eine Verlaufskontrolle durch Proteinnachweis im Westernblot. In Abbildung 3-14 ist im Westernblot neben der zu erwartenden 60 kDa Bande für das Protein TCP1 alpha auch ein deutliches Signal bei etwa 120 kDa zu erkennen. Die obere Bande verliert nach 2,5 Stunden an Signalintensität, die untere beginnend ab 3 Stunden mit einer Abnahme bis zum 6 Stunden Zeitpunkt. Spaltfragmente sind nicht nachweisbar.



**Abbildung 3-14. Abbau von TCP1 alpha nach TNF-Stimulation.** Zu sehen sind zwei Bandenmuster. Zum einen bei 60 kDa das native Protein TCP1 alpha und zum anderen ein Signal bei ungefähr 120 kDa, das bei 2,5 Stunden an Signalintensität verliert. ctrl = unstimulierte Kontrolle. GAPDH dient hier als Ladekontrolle.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob durch den Einsatz des Aspartatproteaseinhibitors Pepstatin A die Degradation des Proteins durch TNF-Stimulation inhibiert werden kann. Hierfür wurden U937-Zellen für 5 Stunden unbehandelt oder jeweils mit TNF allein oder TNF und Pepstatin A stimuliert.

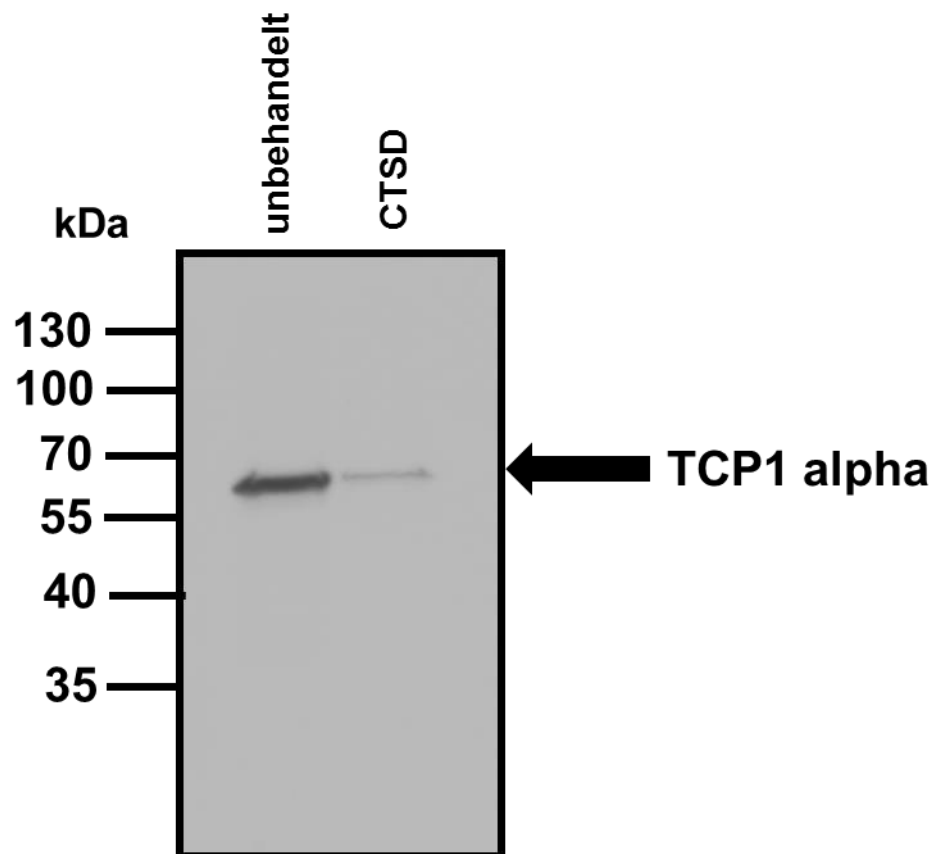
Abbildung 3-15 zeigt in einem Westernblot, dass im Vergleich zur alleinigen TNF-Stimulation eine Inkubation mit Pepstatin A zu keiner Inhibition der Degradation führt. Die 60 kDa Bande zeigt den durch TNF-Stimulation bekannten Signalintensitätsverlust an. Der Signalverlust der oberen 120 kDa Bande findet im Vergleich zur TNF-Stimulation ohne Pepstatin A-Vorbehandlung allerdings leicht verzögert statt.



**Abbildung 3-15. Inhibition der Proteolyse durch Pepstatin A.** Gezeigt ist in diesem Westernblot, dass nach TNF-Stimulation und Pepstatin A-Inkubation in der 60 kDa Bande kein signifikanter Unterschied zur reinen TNF-Stimulation besteht. Der Signalintensitätsverlust in der 120 kDa Bande ist hingegen verzögert. Aktin dient hier als Ladekontrolle.

Um zu untersuchen, ob TCP1 alpha ein Substrat der Protease Cathepsin D ist wurde *in vitro* Cathepsin D zu rekombinantem Protein hinzugegeben. Anschließend erfolgte zur Darstellung der Ergebnisse die Durchführung einer SDS-PAGE. Ein Gel wurde mit Coomassie gefärbt, um eine massenspektrometrische Untersuchung folgen lassen zu können.

In Abbildung 3-16 ist in einem Westernblot bei 60 kDa das native Protein der mit Cathepsin D behandelten Probe gegenübergestellt worden. Zu erkennen ist deutlich ein Verlust der Signalintensität in der mit Cathepsin D behandelten Probe. Das Entstehen von Spaltungsfragmenten konnte nicht beobachtet werden. Daraus folgt, dass Cathepsin D TCP1 alpha proteolytisch degradieren kann.



**Abbildung 3-16. In-vitro-Verdau von TCP 1 alpha mit CTSD.** Bei 60 kDa ist in diesem Westernblot die Bande für TCP 1 alpha in der unbehandelten Probe zu erkennen. Nach dreistündiger Inkubation mit CTSD bei einem pH von 5.0 und einer Temperatur von 37°C erscheint die Bande in der behandelten Probe deutlich schwächer.

### 3.2.2 Kolokalisation von TCP1 alpha und Cathepsin D

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie sollte als nächstes untersucht werden, ob eine räumliche Nähe von TCP1 alpha und Cathepsin D in der Zelle besteht und so Rückschlüsse über eine mögliche Interaktion beider Proteine getroffen werden können.

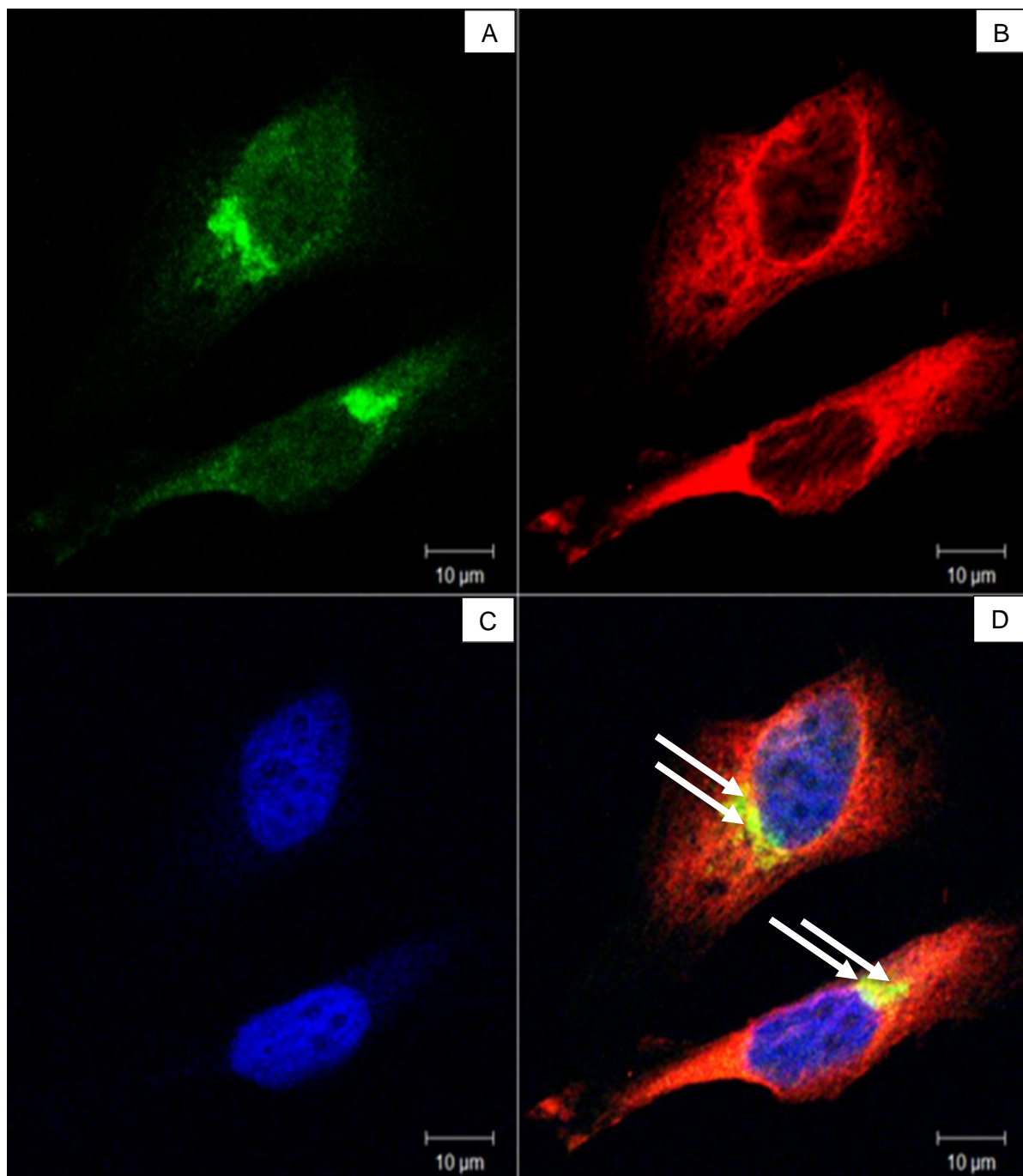
Abbildung 3-17 zeigt für TCP 1 alpha in grüner Fluoreszenzfärbung und Cathepsin D in roter bei 60 Minuten eine deutliche Kolokalisation. Obwohl Cathepsin D und TCP 1 alpha sich in der Einzelfarbdarstellung eher diffus verteilen, existieren Kolokalisationen, wie in Abbildung 3-17-D gezeigt, schwerpunktmäßig um den Zellkern herum angeordnet. Eine Kolokalisation an der Plasmamembran ist nicht nachweisbar.

### 3.2.3 Massenspektrometrische Bestimmung der Cathepsin D-Spaltstellen

Nachdem *in vitro* gezeigt werden konnte, dass Cathepsin D TCP1 alpha proteolytisch degradieren kann, sollten nun die Spaltungsstellen genauer charakterisiert werden. Hierbei wurde das ATOMS-Verfahren, eine modifizierte massenspektrometrische Analyseverfahren eingesetzt. Die Messungen wurden von Prof. Tholey durchgeführt und visuell für zwei unabhängige Proben aufbereitet.

Abbildung 3-18 führt die durch ATOMS gefundenen Schnittstellen am Protein TCP1 alpha auf. Dabei ist zu erkennen, dass keine größeren zusammenhängenden Spaltfragmente entstehen. Über die gesamte Länge des Vollproteins von 556 Aminosäuren finden sich Spaltungsstellen verteilt. Es findet eine nahezu vollständige Degradation ohne Entstehung von Neoproteinen statt.

Abbildung 3-19 zeigt in der Primärstruktur von TCP1 alpha in roter Farbe markiert die durch die massenspektrometrische Analyse gefundenen Spaltungsstellen.



**Abbildung 3-17. Kolokalisation von CTSD und TCP1 alpha.** (A) TCP1 alpha in grüner Fluoreszenz. (B) Cathepsin D in roter Fluoreszenz. (C) DAPI Kernfärbung in blauer Fluoreszenz. (D) Kolokalisation ist als gelbe Signalüberlagerung erkennbar (weiße Pfeile).

Start	End	Sequence	BR1			BR2		
			PSMs	Quan Count	Average	PSMs	Quan Count	Average
65	77	LEVEHPAAKVLCE*	19	6	100	22	6	60.7
98	122	AELLKNADELVKQKIHPTSVISGYR	16	7	93.2	16	6	43.3
98	122	AELLKNADELVKQKIHPTSVISGYR*	2	2	100	2	2	100
175	185	AVLAIKYTDIR	2	2	23.1	6	3	26.3
178	185	AIKYTDIR	11	6	100	5	3	100
178	185	AIKYTDIR*	6	3	100	6	3	100
288	309	TTGGIDDMCLKYFVEAGAMAVR	12	3	73.7	6	2	57.9
300	309	FVEAGAMAVR	12	3	100	12	3	100
300	310	FVEAGAMAVRR	10	3	100	6	3	100
329	355	STLANLEGEETFEAAMLGQAEEVVQER	18	6	82.5	7	4	28.5
332	355	ANLEGEETFEAAMLGQAEEVVQER	13	4	45.5	6	3	24.4
341	350	EAAMLGQAEE*	12	3	6.4	2	2	100
341	355	EAAMLGQAEEVVQER	6	5	95.2	12	7	86.2
344	355	MLGQAEEVVQER	12	3	6.4	10	3	3.7
446	468	LVIPNTLAVNAAQDSTDVAKLR	33	9	100	21	9	100
446	468	LVIPNTLAVNAAQDSTDVAKLR*	14	6	100	27	9	100
447	468	VIPNTLAVNAAQDSTDVAKLR	9	3	41.9	4	3	75.8
453	468	AVNAAQDSTDVAKLR	56	7	100	24	6	100
453	468	AVNAAQDSTDVAKLR*	30	9	97.8	10	3	100

**Abbildung 3-18. Massenspektrometrische Bestimmung der Spaltungsstellen an TCP 1 alpha.** Aufgeführt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Messungen. Die Schnittstellen verteilen sich diffus über die Gesamtlänge des 556 Aminosäuren umfassenden Proteins.

```

MEGPLSVFGD RSTGETIRSQ NVMAAASIAN IVKSSLGPVG LDKMLVDDIG
DVTITNDGAT ILKLLEVEHP AAKVLC ELAD LQDKEVGDGT TSVVIAAEL
LKNADELVKQ KIHPTSVISG YRLACKEAVR YINENLIVNT DELGRDCLIN
AAKTSMSISKI IGIN G DFFAN MVVDAVLAIK YTDIRGQPRY PVNSVNILKA
HGRSQMESML ISGYALNCVV GSQGMPPKRV NAKIACLD FS LQKTKMKLGV
QVWITDPEKL DQIRQRES DI TKERIQKILA TGANVILTTG GIDDMCLKYF
VEAGAMAVRR VLKRD LKRIA KASGATILST LANLEGEETF EAAMLGQAEE
VVQERICDDE LILIKNTKAR TSASILRGA NDFMCDEMER SLHDALCVVK
RVLESKSVVP GGGAVEAALS IYLENYATSM GSREQ LAIAE FARSLLVIPN
TLAVNAAQDS TDLVAKLRAF HNEAQVNPER KNLKWIGLDL SNGKPRDNKQ
AGVF EPTIVK VKSLKFATEA AITILRIDDL IKLHPESKDD KHGSYEDAVH
SGALND

```

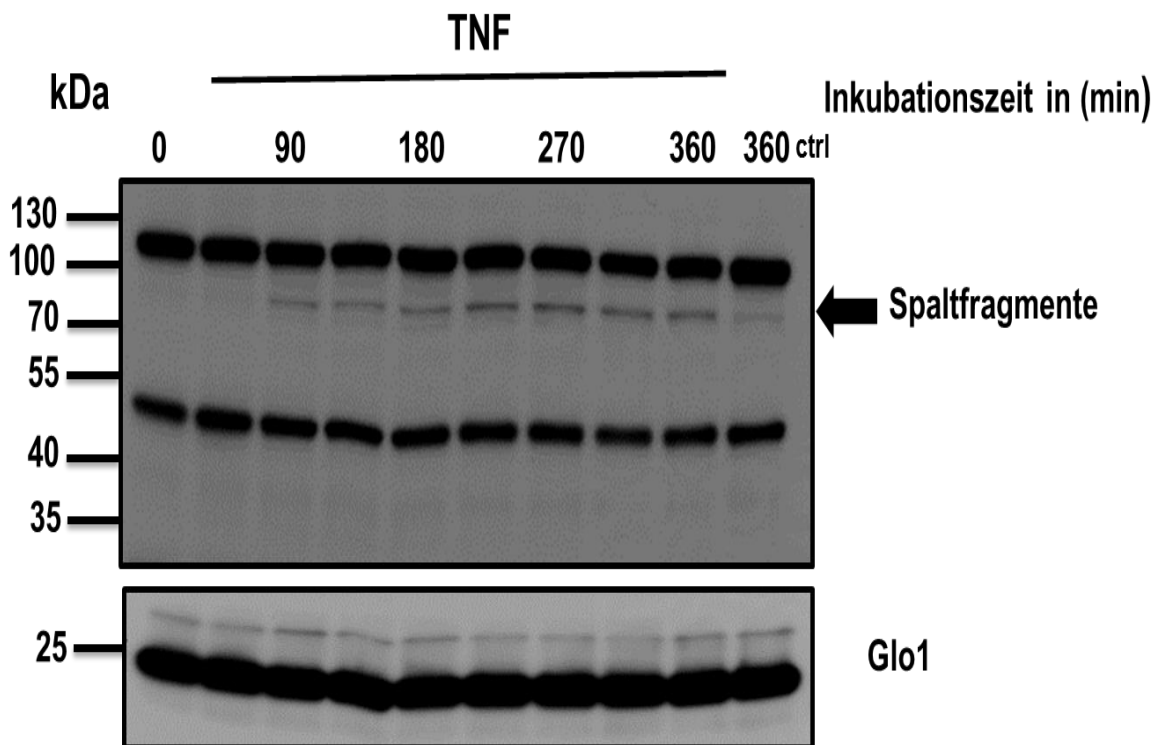
**Abbildung 3-19. TCP1 alpha Primärsequenz mit CTSD Schnittstellen.** In rot markiert finden sich die durch das ATOMS-Verfahren beschriebenen Spaltungsstellen.

### 3.3 Substrat GARS-AIRS-GART

#### 3.3.1 Spaltfragmente von GARS-AIRS-GART nach TNF-Stimulation

Um zu untersuchen, ob durch eine TNF-Stimulation das Protein GARS-AIRS-GART proteolytisch degradiert werden kann wurden U937-Zellen insgesamt sechs Stunden mit TNF stimuliert.

Abbildung 3-20 zeigt nach neunzig Minuten das Aufkommen einer neuen Bande im Westernblot zwischen 70 kDa und 100 kDa, die als Spaltfragment angesehen wird. Die Bande für das Vollängenprotein bei 110 kDa und der Splicevariante bei 50 kDa erscheinen bei konstanter Signalintensität über die volle Zeit der sechsständigen TNF-Stimulation.

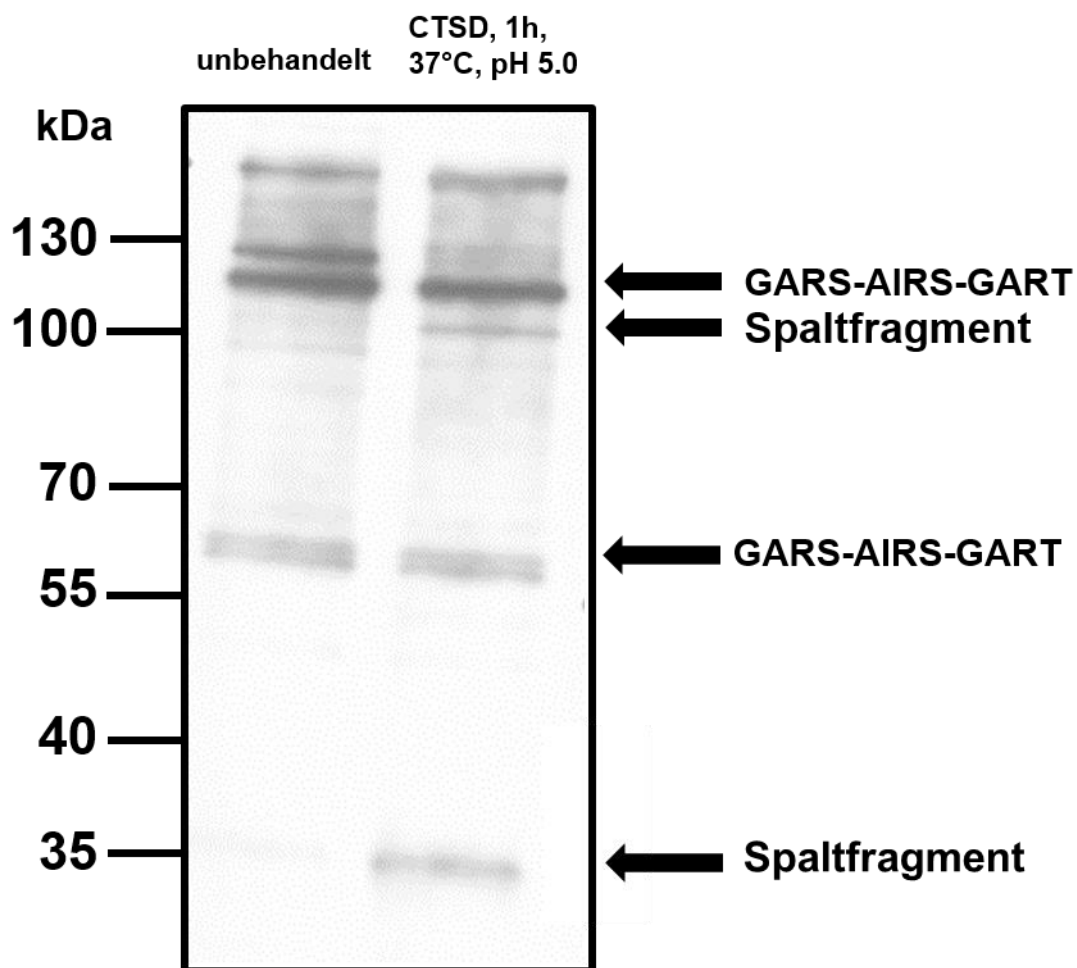


**Abbildung 3-20. Entstehung von Spaltfragmenten nach TNF-Stimulation.** Bei 90 Minuten ist das Aufkommen einer neuen Bande zwischen 70 kDa und 100 kDa zu erkennen. Glo1 dient hier als Ladekontrolle. ctrl = unstimulierte Kontrolle.

Für die Untersuchung des trifunktionalen Proteins ergab sich die Schwierigkeit, dass das Vollängenprotein in der 110 kDa Form kommerziell nicht verfügbar war. Demzufolge war ein In-vitro-Verdau mit rekombinantem Gesamtprotein nicht durchführbar.



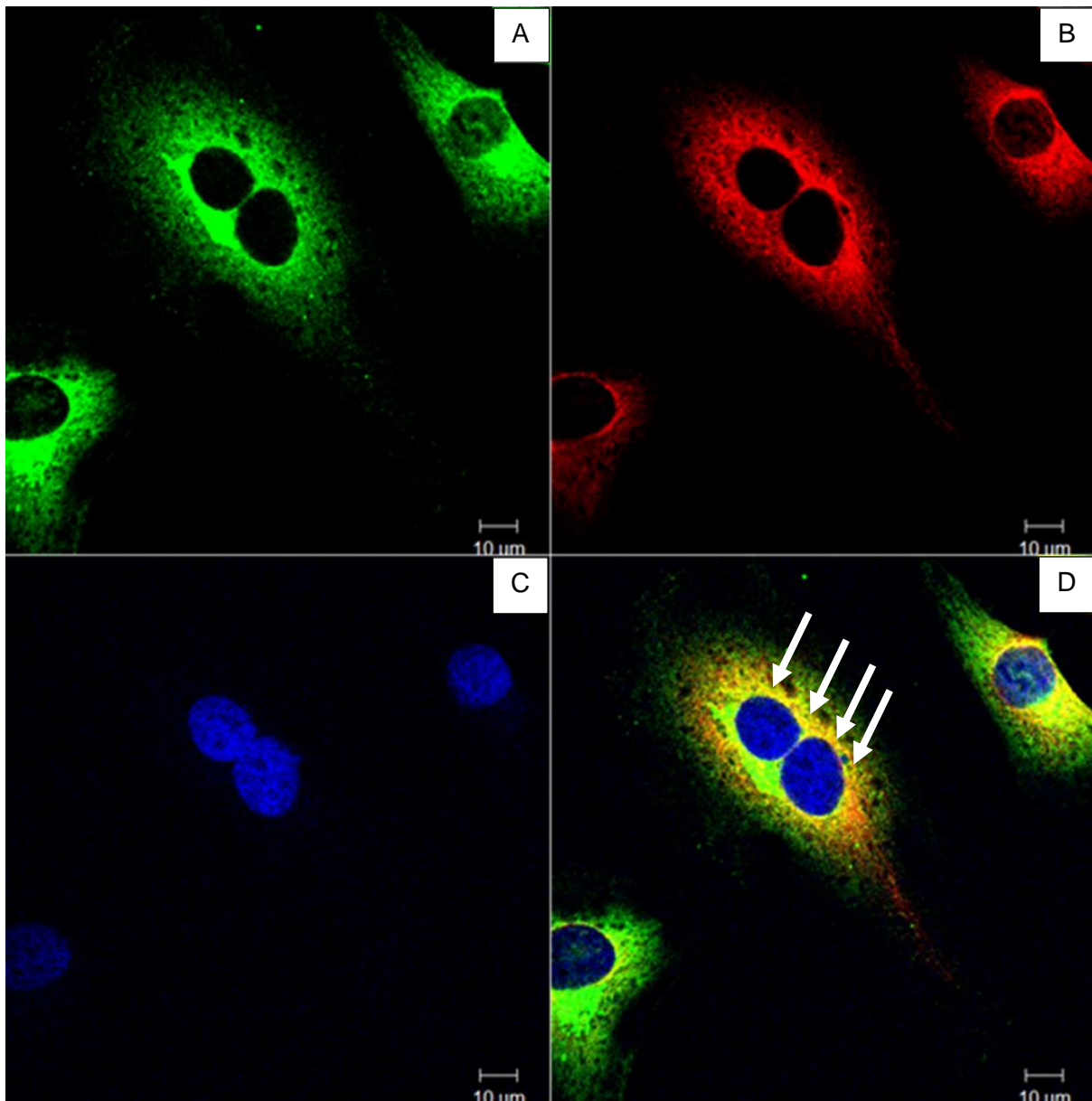
Der In-situ-Verdau von GARS-AIRS-GART mit Cathepsin D ist in Abbildung 3-21 dargestellt. U937-Zellen wurden dafür eine Stunden lang bei 37 °C inkubiert und das Protein anschließend präzipitiert. Abbildung 3-21 zeigt in der mit Cathepsin D behandelten Probe im Westernblot zwei in der mitgeführten unbehandelten Kontrollprobe nicht nachweisbare Signalbanden. Zum einen etwas marginal bei 35 kDa und zum anderen unterhalb der 100 kDa Bande. Diese werden als Spaltfragmente interpretiert.



**Abbildung 3-21. In-situ-Verdau von GARS-AIRS-GART mit Cathepsin D.** In der mit Cathepsin D behandelten Probe ist das Aufkommen zweier neuer Bandenmuster zu erkennen. Das erste Signal erscheint unterhalb der 100 kDa Bande, das zweite bei 35 kDa.

### 3.3.2 Kolokalisation von GARS-AIRS-GART und Cathepsin D

Die Immunfluoreszenzmikroskopie stellt in Abbildung 3-22 GART (**A**) bei 488 nm (grün) und Cathepsin D (**B**) bei 555 nm (rot) dar. Im Ausschnitt (**C**) ist der Kern mit DAPI blau gefärbt. Kolokalisationen sind in (**D**) als gelbe Spots zu erkennen, die sich bei GART saumartig um den Zellkern legen. Der Beobachtungszeitpunkt zeigt die Zellen nach 60 Minuten TNF-Stimulation. Somit konnte gezeigt werden, dass GARS-AIRS-GART und Cathepsin D kolokalisieren.



**Abbildung 3-22. Kolokalisation von GART und Cathepsin D.** (A) GART grün, (B) Cathepsin D rot, (C) DAPI Kernfärbung (blau) und (D) Kolokalisation (gelb), angezeigt durch weiße Pfeile.

## 4 Diskussion

Das Verständnis über die Funktionsweise und Bedeutung der Proteasen unterliegt seit einigen Jahren einem grundlegenden Wandel. Wurde lange Zeit überwiegend auf die rein proteindegradative, signaltransduktionsterminierende Funktion abgestellt, so erscheinen immer mehr Hinweise dafür, dass durch Proteolyse die Signaltransduktion verstärkt werden kann, sie auch aktivierend wirkt (Turk et al., 2012). Dieser Aspekt wurde in der vorliegenden Arbeit genauer an der Funktion der Aspartatprotease Cathepsin D untersucht.

Schütze et al. beschrieben bereits die Funktion des CTSD im apoptotischen Signalweg des TNFR1. Nach Stimulation des Rezeptors mit TNF wird die Rezeptorinternalisierung initiiert. Es bildet sich das Rezeptosom, das mit CTSD-Proformen enthaltenden Trans-Golgi-Vesikeln zu einem endolysosomalen Kompartiment, dem *multivesicular body* (MVB), fusioniert. Innerhalb dieses Kompartimentes erfolgt in einer proteolytischen Kaskade über die Aktivierung von Caspase 8 und Caspase 7 die Aktivierung der A-SMase, die Ceramide generiert. Ceramide initiieren die autoproteolytische Aktivierung von Cathepsin D und sorgen für dessen Translokation ins Zytosol. Dort spaltet Cathepsin D Bid zu tBid und sorgt für eine konsekutive Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom c mit abschließender Aktivierung der Effektorcaspasen 9 und 3.

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, neben dem schon bekannten Protein Bid potentiell neue Substrate der Protease CTSD zu charakterisieren. Zu Beginn wurden dazu Lysate CTSD-defizienter MEF-Zellen jeweils mit und ohne Cathepsin D stimuliert. Anschließend erfolgte eine 2D-DIGE. Die massenspektrometrische Auswertung führte zur Fokussierung auf die Proteine, die in experimentellen Vergleichen eine signifikante Veränderung in der Signalintensität der unterschiedlichen Proben zeigten. Für die weiteren Untersuchungen wurden daraus die Proteine HSP90, TCP1 alpha und das trifunktionale GARS-AIRS-GART ausgewählt.

Um zu untersuchen, ob die in der 2D-DIGE gefundenen Ergebnisse auch nach TNF-Stimulation auftreten, wurden U937-Zellen sechs Stunden mit TNF stimuliert. Abbildung 3-1 zeigt in einem Westernblot als Ergebnis dieses Versuches das Aufkommen eines als Spaltfragment interpretierten Bandenmusters zwischen 40 kDa und 60 kDa bei 135 Minuten. Zeitgleich findet sich eine diskrete Bande knapp über 100 kDa und bei 180 kDa, die Ausdruck einer gespaltenen dimerisierten Form von HSP90 sein könnte oder einer posttranslationalen Modifikation einer HSP90-Isoform, die ebenfalls durch diesen Antikörper erkannt werden kann. Um diese Thesen zu überprüfen müssten zum einen Polyacrylamidgele verwendet werden, die eine höhermolekulare Auflösung erlauben. Posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Acetylierung, Glykosylierung oder Phosphorylierung sind durch das Verfahren der 2D-DIGE mit Massenspektrometrie zugänglich.

Durch Einsatz des spezifischen Aspartatproteaseinhibitors Pepstatin A konnte in Abbildung 3-2 gezeigt werden, dass das Auftreten der spezifischen Bandenmuster zwischen 40 kDa und 60 kDa verhindert wird. Zur Dokumentation der Spezifität der CTSD-Wirkung wurden aus der Familie der Hitzeschockproteine auch HSP70 und HSP47 mit TNF stimuliert. Dabei konnten keine Spaltprodukte nachgewiesen werden.

Für HSP70 ist eine membranstabilisierende Wirkung am lysosomalen Kompartiment beschrieben, die Einfluss auf die Translokation des CTSD aus dem Kompartiment in das Zytosol haben könnte (Jäättelä et al., 2004). Demzufolge wäre eine Degradation durch CTSD vorstellbar. Möglicherweise interagieren eher Ceramide mit HSP70, um eine Membranpermeabilisierung zu ermöglichen. Denkbar wäre auch eine Einbindung von HSP70 in einen hochmolekularen Komplex innerhalb des Chaperonkomplexes, der eine katalytische Aktivität von CTSD unterbindet.

Zur abschließenden Demonstration, dass HSP90 durch Cathepsin D gespalten werden kann wurde rekombinantes HSP90 mit humanem Leber-CTSD nach Protokoll inkubiert. Im Westernblot der Abbildung 3-3 erscheinen die auch im TNF-Stimulationsexperiment beobachteten Bandenmuster zwischen 40 kDa und 60 kDa. Festgehalten werden kann an dieser Stelle, dass HSP90 ein Substrat der Aspartatprotease Cathepsin D ist.

Der Versuch, durch das Verfahren der Immunpräzipitation HSP90-Spaltfragmente anzureichern gelang nicht. In Abbildung 3-4 erscheint im Westernblot in der mit TNF stimulierten Probe lediglich die native 90 kDa Bande. Dies mag vielleicht an der Dauer der TNF-Stimulation liegen, die jedoch mit drei Stunden deutlich in dem zeitlichen Bereich lag, wo im Eingangsexperiment der Abbildung 3-1 mit dem Auftreten der Spaltfragmente zu rechnen war. Gegen eine Funktionsunfähigkeit der Protein G-Microbeads spricht die Tatsache, dass die HSP90-Majorform präzipitiert werden konnte. Denkbar wäre auch eine molekulare Veränderung oder reaktive Unzugänglichkeit des Epitops. Dies könnte zum einen durch Einbindung der Fragmente in einen Multiproteinkomplex, eine räumliche Veränderung der Oberflächenstruktur oder Bindung an ein anderes Protein möglich werden. Zudem könnte das Epitop durch eine andere Protease verändert worden sein.

Dass eine räumliche Nähe zwischen HSP90 und Cathepsin D bestehen muss, zeigen immunfluoreszenzanalytische Untersuchungen. Abbildung 3-5 illustriert in Bildausschnitt D die Überlagerung der Fluoreszenzmuster von HSP90 und Cathepsin D zur gelblichen Fluoreszenz. Über diese Kolo-kalisation kann auf eine starke räumliche Interaktion rückgeschlossen werden, ohne diese jedoch genauer spezifizieren zu können. Zu erkennen sind teilweise Kolo-kalisationen in einem zytosolischen Saum um den Zellkern herum und an der Plasmamembran. Das perinukleäre Verteilungsmuster steht in Übereinstimmung mit der Vorstellung, dass zur Bildung von Spaltprodukten Cathepsin D erst lysosomal aktiviert werden muss, ein Vorgang, der nicht am Beginn der Internalisierung stattfindet. Dieser Argumentation steht die an der Plasmamembran beobachtete Kolo-kalisation entgegen, es sei denn, dass HSP90 und Cathepsin D dort eine andere biologische Funktion zukäme. HSP90 besitzt zu seiner zytosolischen auch eine extrazelluläre Funktion, für die es exozytiert wird.

Bestimmte Formen von Mammatumoren, die den humanen epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (Her-2) überexprimieren interagieren extrazellulär als bekannte Klientenproteine mit HSP90, was für die Rezeptoraktivierung notwendig ist. Über eine anschließende Aktivierung der MAPK- und PI3K-Akt-Signaltransduktionskaskade erfolgt intrazellulär ein Aktinrearrangement mit Veränderung der Zellmotilität. Dieser Vorgang ist für Metastasierungen von Tumoren von Bedeutung (Sidera et al., 2008).

Viele Proteasen sind ebenfalls in Tumorzellen überexprimiert. Daneben kann es zu einer veränderten intrazellulären Lokalisierung und Alteration der proteolytischen Aktivität der Proteasen kommen.

Für Cathepsin D ist auch eine extrazelluläre Lokalisierung bei Tumoren beschrieben worden, wobei beispielsweise bei Mammatumoren die proteolytisch inerte 52 kDa Form para- und autokrin wirken soll (Masson et al., 2010). Interessant wäre in diesem Zusammenhang zum einen eine Untersuchung darüber, ob Cathepsin D extrazellulär HSP90 spaltet und dabei auch die bekannten Spaltfragmente entstehen. Zum anderen könnte geprüft werden, ob natives HSP90 oder potentielle Spaltfragmente eine Modulation des Signaltransduktionsweges der Todesrezeptoren bewirken. In diesem Zusammenhang könnte auch untersucht werden, ob die Koloalisationen an der Plasmamembran in jedem Stadium der Tumorzellentwicklung vorhanden sind oder möglicherweise als Zeichen einer beginnenden Metastasierung der fortgeschrittenen Entwicklung anzusehen wären. Hierzu könnten beispielsweise Längsschnittuntersuchungen an verschiedenen Zellreihen unterschiedlicher Differenzierungsstadien mit der Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden.

Zur genaueren Bestimmung der Cathepsin D-Schnittstellen und der damit verbundenen Entstehung der Neoproteine wurde das modifizierte massenspektrometrische ATOMS-Verfahren durchgeführt. Abbildung 3-6 beschreibt für zwei unabhängige Messungen den genauen Lokus der potentiellen Schnittstellen bezogen auf die Aminosäuresequenz. Abbildung 3-7 visualisiert dazu in rot die entstandenen Peptide. Die Verteilung der Schnittstellen erstreckt sich dabei schwerpunktmäßig auf den M- und C-Terminus des Vollängenproteins. Richter et al. beschreiben, dass durch die Bindung von Kofaktoren an den C-Terminus eine Inhibierung der ATPase-Aktivität erreicht wird. Eine isolierte Spaltung vom C-Terminus bei funktionsfähiger N-Domäne könnte demzufolge dem Spaltprodukt eine unregulierte Bindungsautonomie ermöglichen. Eine Dimerisierung könnte dagegen nicht mehr stattfinden. Diese Vermutung wird experimentell gestützt durch das zeitgleich zur bekannten 40 kDa bis 60 kDa Bande auftretende Bandenmuster knapp oberhalb von 100 kDa in Abbildung 3-1, was vermutlich Spaltfragmente aus höhermolekularen, dimerisierten HSP90-Komplexen darstellt.

Berechnungen zur Molekularmasse der Spaltfragmente korrelierten eng mit der in TNF-Stimulationsexperimenten gefundenen Größe von 40 kDa bis 60 kDa und lassen so zwei TNF-induzierte Cathepsin D Spaltstellen am Phenylalanin in Position 437 und am Tyrosin in Position 465 postulieren.

Um die biologische Aktivität der so bestimmten Neoproteine zu untersuchen, könnten diese experimentell überexprimiert werden und damit mögliche Auswirkungen auf die TNF-Signaltransduktion bestimmt werden. Zum anderen könnten Punktmutationen an den Cathepsin D-Schnittstellen eingebracht werden. Dies könnte einerseits bei reduzierter Degradation von HSP90 zu einer Stabilisierung des Proteins und damit einhergehend zu einer gleichbleibenden oder reduzierten Apoptoseaktivität führen. Andererseits könnte durch die Mutagenese auch eine beschleunigte Degradation mit Amplifizierung der apoptotischen Signaltransduktion erfolgen. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Frage des Einflusses der Neoproteine *upstream* und *downstream* des lysosomalen Kompartiments. Denkbar wäre eine beschleunigte Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion, eine mögliche Interaktion mit der Plasmamembran mit Veränderung der *lipid rafts* oder eine apoptotisch signalverstärkende Wirkung auf die Effektorcaspasen. Zudem könnten die Untersuchungen dahingehend ausgeweitet werden, die Rolle von HSP90 bei anderen Mitgliedern der *death receptor family* zu untersuchen.

Da der Aspartatproteaseinhibitor Pepstatin A theoretisch neben Cathepsin D auch Cathepsin E und Pepsin inhibiert, sollte in einer abschließenden experimentellen Untersuchung der vorliegenden Arbeit die Proteinexpression von Cathepsin D direkt auf genomischer Ebene beeinflusst werden. Hierzu sollte direkt die Wirkung auf die Substrate beobachtet werden können. Abbildung 3-8 zeigt dazu die Ergebnisse, die mittels siRNA durchgeführt worden. Hierbei zeigte sich nach 48 Stunden bis zu 96 Stunden nach Transfektion jedoch eine Cathepsin D-Aktivität. Eine Transfektion zur Herunterregulation von Cathepsin D war somit leider nicht erfolgreich. Möglicherweise hätte der Effekt einer Retransfektion nach 48 Stunden oder 72 Stunden zu einem stabileren Ergebnis der Herunterregulation geführt.

Bereits Tietz et al. beschrieben U937-Zellen als eine schwierig zu transfizierende Zelllinie, so dass parallel ein experimenteller Ansatz mit shRNA unternommen worden ist. Abbildung 3-9 zeigt in einem Westernblot das Ergebnis für drei stabile Klone B2, G10 und G11. Eine Cathepsin-D Aktivität ist mit einem monoklonalen Antikörper 24 Stunden nach Transfektion, im Gegensatz zum siRNA-Ansatz, hier nicht mehr nachweisbar.

Ein parallel dazu durchgeführter Cathepsin D-Aktivitätsassay bestätigte in Abbildung 3-10 eindrücklich das reduzierte Cathepsinaktivitätsniveau in den transfizierten Klonen. Die zusätzliche Gabe von Pepstatin A konnte das Aktivitätsniveau noch weiter senken, so dass nicht von einer vollständigen Inhibition auszugehen ist. Die ersten Experimente mit den Klonen aus Abbildung 3-1 wurden wiederholt. Dabei zeigt Abbildung 3-11 exemplarisch für alle Klone, dass nach TNF-Stimulation die Spaltfragmente von HSP90 auftreten. Zur Kontrolle wurden Lysate aus allen Klonen 48 Stunden nach Transfektion angefertigt und im Westernblot mit einem Antikörper gegen Cathepsin D auf eine Proteinexpression analysiert. In Abbildung 3-12 erscheinen dabei in allen Klonen die mature 52 kDa Form sowie die *heavy-* (34 kDa) und *light-chain* (14 kDa).

Diese Ergebnisse dokumentieren insgesamt eine erfolgreiche Transfektion der Zelle, die jedoch nicht stabil blieb. Da die shRNA ähnlich wie die siRNA im Zytosol aktiv die mRNA beeinflusst, ist davon auszugehen, dass ähnliche Mechanismen der Abwehr wirksam geworden sein könnten. Möglicherweise ist das Proteinexpressionsniveau von Cathepsin D in Tumorzellen variabel an zelluläre Stressoren adaptierbar. Der CTSD-Aktivitätsassay nach shRNA-Transfektion zeigte bereits, dass eine vollständige Inhibition nicht gelang und eine Grundaktivität erhalten blieb. Dieses Grundniveau könnte im Sinne einer negativen Rückkopplung reaktiv stark erhöht worden sein.

Zur direkten genomischen Beeinflussung auf DNA-Ebene wurde anschließend die CRISPR/Cas9-Methode verwendet. Hierzu wurde das CRISPR-Plasmid mit einem GFP-*tag* versehen, dessen grünfluoreszierende Eigenschaft bei erfolgreicher Transfektion sichtbar gemacht werden kann. Abbildung 3-13 zeigt in (A) den Zustand 24 Stunden nach Transfektion mit kaum nachweisbarer Fluoreszenz. Demgegenüber erscheint unter (B) 48 Stunden nach Transfektion in Kanal 2 (Ch02) der ImageStream®-Auswertung eine Transfektionsquote von ungefähr 70 % bei deutlicher Grünfluoreszenz. Die Selektion der Klone dauert noch an und war bei Drucklegung der vorliegenden Arbeit noch nicht abgeschlossen.

Zur Untersuchung des zweiten ausgewählten Proteins TCP 1 alpha wurden U937-Zellen sechs Stunden nach Protokoll mit TNF stimuliert. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3-14. Zu erkennen sind zwei distinkte Bandenmuster. Die zu erwartende 60 kDa- und eine 120 kDa-Bande. Das Signal der 60 kDa Bande verliert nach 3,5 Stunden an Signalintensität, das 120 kDa-Signal

schon nach einer Stunde. Spaltfragmente konnten im Westernblot nicht nachgewiesen werden. Die 120 kDa Bande scheint einen höhermolekularen TCP 1 alpha-Komplex darzustellen, der dimerisiert vorliegt. Der frühe Verlust in der Signalintensität der 120 kDa Bande nach einer Stunde lässt auf eine rasche Degradation schließen. Im Gegensatz zu HSP90 ist TCP 1 alpha eher durch eine Beteiligung an der *de novo* Proteinbiosynthese charakterisiert. Sternlicht et al. sehen die Beteiligung von TCP 1 alpha bei der Synthese der Proteine Aktin und Tubulin in diesem Zusammenhang als essenziell an. Dieser Ansicht folgend ist eine Aufrechterhaltung der Produktion zytoskelettaler Proteine bei Progredienz der Apoptose nicht mehr erforderlich, so dass der Abbau als ein frühzeitiger Hinweis für eine Entscheidung im weiteren Zellschicksal angesehen werden kann. Im Vergleich dazu treten die ersten Spaltfragmente bei HSP90 erst nach ungefähr 135 Minuten auf. Auch hier wäre es interessant den Aspekt der Dimerisierung durch Verwendung variierteter Polyacrylamidgele zu untersuchen. Möglicherweise existieren höhermolekulare Komplexe aus vielfach dimerisierten Strukturen, die sensibler auf apoptotische Signale mit einer frühen Degradation reagieren.

Abbildung 3-15 zeigt in einer Gegenüberstellung isoliert TNF stimulierte und vorher mit Pepstatin A inkubierte U937-Zellen nach TNF-Stimulation in einem Westernblot. Die Verwendung des Aspartatproteaseinhibitors verändert den TNF stimulierten Signalintensitätsverlust in der 60 kDa Bande in beiden Proben nicht. In der dimerisierten Form bei 120 kDa der mit Pepstatin A vorinkubierten Versuchsreihe kommt es hingegen zu einer deutlichen Verzögerung des Signalintensitätsverlustes um ungefähr zwei Stunden. Ursächlich dafür könnten eine andere Protease oder spezifische posttranslationale Modifikationen sein, die eine von Cathepsin D unabhängige, verzögerte Degradation ermöglichen. Um diese These zu prüfen, könnten bei gleichem experimentellem Ansatz Antikörper gegen andere Proteasen getestet werden.

Ein In-vitro-Verdau von rekombinantem TCP 1 alpha mit exogenem, humanem Leber-Cathepsin D zeigt in Abbildung 3-16 deutlich einen Signalintensitätsverlust bei 60 kDa. Exogenes Cathepsin D spaltet somit TCP 1 alpha.

Um eine räumliche Vorstellung von der Verteilung von TCP1 alpha und einer möglichen Interaktion mit Cathepsin D in der Zelle zu bekommen, wurden Untersuchungen mit der Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Hierbei zeigte sich in Abbildung 3-17 (D) eine deutliche Kolokalisation von TCP 1 alpha mit Cathepsin D fokussiert um den Zellkern herum. An der Plasmamembran sind keine Kolokalisationen nachweisbar. Im Unterschied zu HSP90 scheint sich für TCP1 alpha nur eine Aussage über einen möglichen Ort der Degradation in der Zelle treffen zu lassen. Gestützt wird diese These durch massenspektrometrische Untersuchungen nach dem ATOMS-Verfahren. Abbildung 3-18 zeigt dabei für zwei unabhängige Messungen die Ergebnisse tabellarisch aufgearbeitet. Die Schnittstellen von Cathepsin D bezogen auf das Volllängenprotein in Abbildung 3-19 sind dabei über die gesamte Länge des Proteins verteilt. Dies korreliert gut mit im Westernblot nicht nachweisbaren Spaltfragmenten. TCP 1 alpha scheint vollständig degradiert zu werden. Denkbar wäre hingegen auch eine Stabilisierung des Proteins, wenn man dabei an seine Beziehung zu den zytoskelettalen Proteinen Aktin und Tubulin denkt und deren Funktion bei der Zellmotilität, wie sie beispielsweise bei der Metastasierung von Bedeutung ist.

Für das trifunktionale Protein GARS-AIRS-GART wurde eine TNF-Langzeitstimulation über sechs Stunden durchgeführt. Dabei erschien knapp unterhalb der 100 kDa Bande nach etwa zwei Stunden ein neues Bandenmuster, das als Spaltfragment angesehen werden könnte.

Zudem bleibt die Signalintensität beim Volllängenprotein bei 110 kDa und der Splicevariante bei 50 kDa nahezu unverändert. Dies mag darin begründet sein, dass GARS-AIRS-GART kein Exklusivsubstrat der Protease Cathepsin D ist. Vermutlich ist nur ein Protein dieses trifunktionalen Komplexes ein Substrat der Protease. Da unterhalb der Splicevariante GARS keine Fragmente beobachtet wurden, scheint GARS wahrscheinlich nicht in Betracht zu kommen. Um dies genauer zu untersuchen könnten die einzelnen Proteine in einem *in vitro* Reaktionsansatz mit Cathepsin D inkubiert werden. Dies stellte sich als momentan nicht durchführbar heraus, da das Volllängenprotein kommerziell nicht erhältlich war. Ein durchgeführter *in vitro* Reaktionsansatz zeigt in Abbildung 3-21 das Erscheinen der auch im Westernblot beschriebenen Struktur knapp unter 100 kDa. Diese besteht neben einer als unspezifisch gewerteten Bande unterhalb von 35 kDa, die in wiederholenden Experimenten im Westernblot nicht dokumentiert werden konnte. Durch Inkubation mit dem Aspartatproteaseinhibitor Pepstatin A konnte nur eine teilweise Aufhebung der Spaltung erreicht werden. Das Auftreten des Spaltfragmentes trifft zeitlich ungefähr mit dem Auftreten der Spaltfragmente bei HSP90 zusammen.

Abbildung 3-22 (D) zeigt die Ergebnisse zu immunfluoreszenzanalytischen Untersuchungen mit GARS-AIRS-GART und Cathepsin D. Hierbei erscheint ein diffuses Kollokalisationsmuster mit sowohl perinukleärer als auch zytoplasmischer Konzentration. Im Unterschied zu HSP90 und TCP1 alpha handelt es sich bei GARS-AIRS-GART nicht um ein Chaperon oder Chaperonin, sondern um einen die Purinbiosynthese katalysierenden Proteinkomplex. Die Purine Adenin und Guanin werden dabei aus Inosinmonophosphat (IMP) synthetisiert. Zur Synthese des IMP wird das trifunktionale GARS-AIRS-GART benötigt. Sollte es in diesem Zusammenhang zu einer Funktionsbeeinträchtigung des Enzymkomplexes durch Cathepsin D kommen, könnte kein IMP generiert werden. In diesem Falle stünde mit dem *salvage pathway* ein alternativer Syntheseweg offen. Hierbei werden Hypoxanthin, Adenin und Guanin metabolisiert. Dieser Weg ist im Vergleich zur *de-novo-Synthese* weniger effektiv, in bestimmten Tumorentitäten jedoch deutlich aktiver (Marinello et al., 1996). Über massenspektrometrische Untersuchungen des Proteinkomplexes könnte die Wirkung von Cathepsin D in diesem Kontext dabei genauer charakterisiert werden.



## Literaturverzeichnis

- Agarwal, S.K. 2011. Biologic agents in rheumatoid arthritis. An update for managed care professionals. *Journal of Managed Care Pharmacy : JMCP* 17, 9 Suppl B, S14-8.
- Banerjee, D., Ghosh, D., Chatterjee, A., Sinha, S., and Nandagopal, K. 2012. No Evidence for Mutations that Deregleulate GARS-AIRS-GART Protein Levels in Children with Down Syndrome. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB* 27, 1, 46–51.
- Banerjee, D., and Nandagopal, K. 2009. Phylogenetic analysis and in silico characterization of the GARS-AIRS-GART gene which codes for a tri-functional enzyme protein involved in de novo purine biosynthesis. *Molecular Biotechnology* 42, 3, 306–319.
- Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W. 1993. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex. Implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 3, 431–445.
- Battegay, E.J., Raines, E.W., Colbert, T., and Ross, R. 1995. TNF-alpha stimulation of fibroblast proliferation. Dependence on platelet-derived growth factor (PDGF) secretion and alteration of PDGF receptor expression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 154, 11, 6040–6047.
- Baumgrass, R., Williamson, M.K., and Price, P.A. 1997. Identification of peptide fragments generated by digestion of bovine and human osteocalcin with the lysosomal proteinases cathepsin B, D, L, H, and S. *Journal of bone and mineral research : The official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12, 3, 447–455.
- Beckmann, R.P., Mizzen, L.E., and Welch, W.J. 1990. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins. Implications for protein folding and assembly. *Science (New York, N.Y.)* 248, 4957, 850–854.
- Boudiaf-Benmammar, C., Cresteil, T., and Melki, R. 2013. The cytosolic chaperonin CCT/TRiC and cancer cell proliferation. *PLOS one* 8, 4, e60895.
- Brodsky, G., Barnes, T., Bleskan, J., Becker, L., Cox, M., and Patterson, D. 1997. The human GARS-AIRS-GART gene encodes two proteins which are differentially expressed during human brain development and temporally overexpressed in cerebellum of individuals with Down syndrome. *Human Molecular Genetics* 6, 12, 2043–2050.
- Buchner, J. 2002. Introduction. The cellular protein folding machinery. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 59, 10, 1587–1588.
- Caldarone, C.A., Barner, E.W., Wang, L., Karimi, M., Mascio, C.E., Hammel, J.M., Segar, J.L., Du, C., and Scholz, T.D. 2004. Apoptosis-related mitochondrial dysfunction in the early postoperative neonatal lamb heart. *The Annals of Thoracic Surgery* 78, 3, 948–955.
- Canuel, M., Korkidakis, A., Konnyu, K., and Morales, C.R. 2008. Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 373, 2, 292–297.

- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 9, 3666–3670.
- Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., and Lenardo, M.J. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science (New York, N.Y.)* 288, 5475, 2351–2354.
- Chen, G., Cao, P., and Goeddel, D.V. 2002. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Molecular Cell* 9, 2, 401–410.
- Cuéllar, J., Martín-Benito, J., Scheres, S.H.W., Sousa, R., Moro, F., López-Viñas, E., Gómez-Puertas, P., Muga, A., Carrascosa, J.L., and Valpuesta, J.M. 2008. The structure of CCT-Hsc70 NBD suggests a mechanism for Hsp70 delivery of substrates to the chaperonin. *Nature Structural & Molecular Biology* 15, 8, 858–864.
- Cunningham, M., and Tang, J. 1976. Purification and properties of cathepsin D from porcine spleen. *The Journal of Biological Chemistry* 251, 15, 4528–4536.
- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S.A., Zamzami, N., and Kroemer, G. 2000. Apoptosis-inducing factor (AIF). A ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS letters* 476, 3, 118–123.
- Deuerling, E., and Bukau, B. 2004. Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 39, 5-6, 261–277.
- Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Stetter, K.O., Huber, H., Huber, R., and Steinbacher, S. 1998. Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell* 93, 1, 125–138.
- Dollins, D.E., Warren, J.J., Immormino, R.M., and Gewirth, D.T. 2007. Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. *Molecular Cell* 28, 1, 41–56.
- Doucet, A., and Overall, C.M. 2011. Broad coverage identification of multiple proteolytic cleavage site sequences in complex high molecular weight proteins using quantitative proteomics as a complement to edman sequencing. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 10, 5, 3533.
- Dougherty, J.J., Rabideau, D.A., Iannotti, A.M., Sullivan, W.P., and Toft, D.O. 1987. Identification of the 90 kDa substrate of rat liver type II casein kinase with the heat shock protein which binds steroid receptors. *Biochimica et biophysica acta* 927, 1, 74–80.
- Dunn, B.M., and Hung, S. 2000. The two sides of enzyme-substrate specificity. Lessons from the aspartic proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 1-2, 231–240.
- Duran, S., Gonzalez, L.A., and Alarcon, G.S. 2007. Damage, accelerated atherosclerosis, and mortality in patients with systemic lupus erythematosus. Lessons from LUMINA, a multiethnic US cohort. *Journal of Clinical Rheumatology : Practical Reports on Rheumatic & Musculoskeletal Diseases* 13, 6, 350–353.

- Edelmann, B., Bertsch, U., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Perrotta, C., Jakob, M., Adam-Klages, S., Kabelitz, D., and Schütze, S. 2011. Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptosomes. *The EMBO journal* 30, 2, 379–394.
- Ellis, R.J., and van der Vies, S.M. 1991. Molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry* 60, 321–347.
- Evans, C.G., Chang, L., and Gestwicki, J.E. 2010. Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 12, 4585–4602.
- Faustman, D., and Davis, M. 2010. TNF receptor 2 pathway. Drug target for autoimmune diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery* 9, 6, 482–493.
- Ferrarini, M., Heltai, S., Zocchi, M.R., and Rugarli, C. 1992. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *International Journal of Cancer* 51, 4, 613–619.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 6669, 806–811.
- Flynn, J.L., Goldstein, M.M., Chan, J., Triebold, K.J., Pfeffer, K., Lowenstein, C.J., Schreiber, R., Mak, T.W., and Bloom, B.R. 1995. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 2, 6, 561–572.
- Fortenberry, S.C., and Chirgwin, J.M. 1995. The propeptide is nonessential for the expression of human cathepsin D. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 17, 9778–9782.
- Fritsch, J., Fickers, R., Klawitter, J., Sarchen, V., Zingler, P., Adam, D., Janssen, O., Krause, E., and Schütze, S. 2016. TNF induced cleavage of HSP90 by cathepsin D potentiates apoptotic cell death. *Oncotarget*.
- Fritsch, J., Stephan, M., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Gubkina, S., Kabelitz, D., and Schütze, S. 2014. Cell fate decisions regulated by K63 ubiquitination of tumor necrosis factor receptor 1. *Molecular and Cellular Biology* 34, 17, 3214–3228.
- Fusek, M., and Vetvicka, V. 1994. Mitogenic function of human procathepsin D. The role of the propeptide. *The Biochemical Journal* 303 (Pt 3), 775–780.
- Gahring, L.C., Carlson, N.G., Kulmar, R.A., and Rogers, S.W. 1996. Neuronal expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  in the murine brain. *Neuroimmunomodulation* 3, 5, 289–303.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. 1998. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392, 6678, 821–824.
- Gartner, E.M., Silverman, P., Simon, M., Flaherty, L., Abrams, J., Ivy, P., and Lorusso, P.M. 2012. A phase II study of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in metastatic or locally advanced, unresectable breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 131, 3, 933–937.

- Gopalakrishnan, M.M., Grosch, H.-W., Locatelli-Hoops, S., Werth, N., Smolenova, E., Nettersheim, M., Sandhoff, K., and Hasilik, A. 2004. Purified recombinant human prosaposin forms oligomers that bind procathepsin D and affect its autoactivation. *The Biochemical Journal* 383, Pt. 3, 507–515.
- Guicciardi, M.E., and Gores, G.J. 2009. Life and death by death receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 6, 1625–1637.
- Gutsche, I., Essen, L.O., and Baumeister, W. 1999. Group II chaperonins: new TRiC(k)s and turns of a protein folding machine. *Journal of Molecular Biology* 293, 2, 295–312.
- Heinrich, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A., and Schütze, S. 2004. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death and Differentiation* 11, 5, 550–563.
- Heinrich, M., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Sandberg, C., Gahr, J., Schwandner, R., Weber, T., Saftig, P., Peters, C., Brunner, J., Krönke, M., and Schütze, S. 1999. Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *The EMBO journal* 18, 19, 5252–5263.
- Hernandez-Pando, R., and Rook, G.A. 1994. The role of TNF-alpha in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology* 82, 4, 591–595.
- Horovitz, A., and Willison, K.R. 2005. Allosteric regulation of chaperonins. *Current Opinion in Structural Biology* 15, 6, 646–651.
- Horwich, A.L., Fenton, W.A., Chapman, E., and Farr, G.W. 2007. Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annual review of cell and developmental biology* 23, 115–145.
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G., and Goeddel, D.V. 1996. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 2, 299–308.
- Jaeken, J., and van den Berghe, G. 1984. An infantile autistic syndrome characterised by the presence of succinylpurines in body fluids. *Lancet (London, England)* 2, 8411, 1058–1061.
- Jiang, Y., Woronicz, J.D., Liu, W., and Goeddel, D.V. 1999. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science (New York, N.Y.)* 283, 5401, 543–546.
- Karin, M., and Chang, L. 2001. AP-1--glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level. *The Journal of Endocrinology* 169, 3, 447–451.
- Kawada, A., Hara, K., Kominami, E., Hiruma, M., Noguchi, H., and Ishibashi, A. 1997. Processing of cathepsins L, B and D in psoriatic epidermis. *Archives of Dermatological Research* 289, 2, 87–93.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. 1972. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 4, 239–257.

- Knee, K.M., Sergeeva, O.A., and King, J.A. 2013. Human TRiC complex purified from HeLa cells contains all eight CCT subunits and is active in vitro. *Cell Stress & Chaperones* 18, 2, 137–144.
- Koblinski, J.E., Ahram, M., and Sloane, B.F. 2000. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 291, 2, 113–135.
- Kokkonen, N., Rivinoja, A., Kauppila, A., Suokas, M., Kellokumpu, I., and Kellokumpu, S. 2004. Defective acidification of intracellular organelles results in aberrant secretion of cathepsin D in cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 38, 39982–39988.
- Kolesnick, R.N., and Krönke, M. 1998. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annual Review of Physiology* 60, 643–665.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews* 87, 1, 99–163.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 5259, 680–685.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. 2007. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death and Differentiation* 14, 1, 44–55.
- Langer, T. 2003. Intracellular localization of the 90 kDa heat shock protein (HSP90 $\alpha$ ) determined by expression of a EGFP–HSP90 $\alpha$ -fusion protein in unstressed and heat stressed 3T3 cells. *Cell Biology International* 27, 1, 47–52.
- Laurent-Matha, V., Derocq, D., Prebois, C., Katunuma, N., and Liaudet-Coopman, E. 2006. Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation. Involvement of cathepsins L and B. *Journal of Biochemistry* 139, 3, 363–371.
- Le Roy, C., and Wrana, J.L. 2005. Signaling and endocytosis. A team effort for cell migration. *Developmental Cell* 9, 2, 167–168.
- Li, J., and Buchner, J. 2013. Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. *Biomedical Journal* 36, 3, 106–117.
- Liao, W., Xiao, Q., Tchikov, V., Fujita, K.-i., Yang, W., Wincovitch, S., Garfield, S., Conze, D., El-Deiry, W.S., Schütze, S., and Srinivasula, S.M. 2008. CARP-2 is an endosome-associated ubiquitin ligase for RIP and regulates TNF-induced NF-kappaB activation. *Current Biology : CB* 18, 9, 641–649.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies. Integrating mammalian biology. *Cell* 104, 4, 487–501.
- Lopez, T., Dalton, K., and Frydman, J. 2015. The Mechanism and Function of Group II Chaperonins. *Journal of Molecular Biology* 427, 18, 2919–2930.
- Luedde, T., and Schwabe, R.F. 2011. NF-kappaB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 8, 2, 108–118.

- Mahul-Mellier, A.-L., Strappazzon, F., Petiot, A., Chatellard-Causse, C., Torch, S., Blot, B., Freeman, K., Kuhn, L., Garin, J., Verna, J.-M., Fraboulet, S., and Sadoul, R. 2008. Alix and ALG-2 are involved in tumor necrosis factor receptor 1-induced cell death. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 50, 34954–34965.
- Marinello, E., Tabucchi, A., Rosi, F., Leoncini, R., Carlucci, F., and Pagani, R. 1996. Purine nucleotide metabolism in lymphocytic leukemia. Behavior of principle enzymes. *Biochemical Society transactions* 24, 1, 51S.
- Martín-Benito, J., Grantham, J., Boskovic, J., Brackley, K.I., Carrascosa, J.L., Willison, K.R., and Valpuesta, J.M. 2007. The inter-ring arrangement of the cytosolic chaperonin CCT. *EMBO reports* 8, 3, 252–257.
- Martinet, W., Schrijvers, D.M., and Kockx, M.M. 2003. Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells. *Biotechnology Letters* 25, 13, 1025–1029.
- Masson, O., Bach, A.-S., Derocq, D., Prebois, C., Laurent-Matha, V., Pattingre, S., and Liaudet-Coopman, E. 2010. Pathophysiological functions of cathepsin D. Targeting its catalytic activity versus its protein binding activity? *Biochimie* 92, 11, 1635–1643.
- Mayor, S., and Pagano, R.E. 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 8, 8, 603–612.
- Micheau, O., and Tschopp, J. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 2, 181–190.
- Nanbu, K., Konishi, I., Mandai, M., Kuroda, H., Hamid, A.A., Komatsu, T., and Mori, T. 1998. Prognostic significance of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas. *Cancer Detection and Prevention* 22, 6, 549–555.
- Nathan, D.F., Vos, M.H., and Lindquist, S. 1997. In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 24, 12949–12956.
- Normant, E., Paez, G., West, K.A., Lim, A.R., Slocum, K.L., Tunkey, C., McDougall, J., Wylie, A.A., Robison, K., Caliri, K., Palombella, V.J., and Fritz, C.C. 2011. The Hsp90 inhibitor IPI-504 rapidly lowers EML4-ALK levels and induces tumor regression in ALK-driven NSCLC models. *Oncogene* 30, 22, 2581–2586.
- Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., Fehrenbacher, N., Lademann, U., Høyer-Hansen, M., Weber, E., Multhoff, G., Rohde, M., and Jäättelä, M. 2004. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *Journal of Experimental Medicine* 200, 4, 425–435. <http://jem.rupress.org/cgi/content/full/200/4/425>.
- Pereira, J.H., Ralston, C.Y., Douglas, N.R., Kumar, R., Lopez, T., McAndrew, R.P., Knee, K.M., King, J.A., Frydman, J., and Adams, P.D. 2012. Mechanism of nucleotide sensing in group II chaperonins. *The EMBO journal* 31, 3, 731–740.
- Pratt, W.B. 1997. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 37, 297–326.

- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D.N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H. 1999. Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *The EMBO journal* 18, 3, 754–762.
- Reissfelder, C., Stamova, S., Gossmann, C., Braun, M., Bonertz, A., Walliczek, U., Grimm, M., Rahbari, N.N., Koch, M., Saadati, M., Benner, A., Buchler, M.W., Jager, D., Halama, N., Khazaie, K., Weitz, J., and Beckhove, P. 2015. Tumor-specific cytotoxic T lymphocyte activity determines colorectal cancer patient prognosis. *The Journal of Clinical Investigation* 125, 2, 739–751.
- Richter, K., Muschler, P., Hainzl, O., Reinstein, J., and Buchner, J. 2003. Sti1 is a non-competitive inhibitor of the Hsp90 ATPase. Binding prevents the N-terminal dimerization reaction during the atpase cycle. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 12, 10328–10333.
- Richter, K., Reinstein, J., and Buchner, J. 2007. A Grp on the Hsp90 mechanism. *Molecular Cell* 28, 2, 177–179.
- Roh, S.-H., Kasembeli, M., Bakthavatsalam, D., Chiu, W., and Tweardy, D.J. 2015. Contribution of the Type II Chaperonin, TRiC/CCT, to Oncogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 11, 26706–26720.
- Saif, M.W., Takimoto, C., Mita, M., Banerji, U., Lamanna, N., Castro, J., O'Brien, S., Stogard, C., and Hoff, D. von. 2014. A phase 1, dose-escalation, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of BIIB021 administered orally in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research : An official Journal of the American Association for Cancer Research* 20, 2, 445–455.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S.J., Krammer, P.H., and Peter, M.E. 1999. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 32, 22532–22538.
- Schmidt, H., Gelhaus, C., Latendorf, T., Nebendahl, M., Petersen, A., Krause, S., Leippe, M., Becker, W.-M., and Janssen, O. 2009. 2-D DIGE analysis of the proteome of extracts from peanut variants reveals striking differences in major allergen contents. *Proteomics* 9, 13, 3507–3521.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Merkel, O., Jakob, M., Hallas, C., Kruse, M.-L., Groitl, P., Lehn, A., Hildt, E., Held-Feindt, J., Dobner, T., Kabelitz, D., Krönke, M., and Schütze, S. 2006. Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism. *The Journal of Clinical Investigation* 116, 11, 2901–2913.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschrwender, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D., and Schütze, S. 2004. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling. Internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity* 21, 3, 415–428.
- Schütze, S., Potthoff, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K., and Krönke, M. 1992. TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 71, 5, 765–776.

- Schütze, S., Tchikov, V., and Schneider-Brachert, W. 2008. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9, 8, 655–662.
- Scroggins, B.T., and Neckers, L. 2007. Post-translational modification of heat-shock protein 90. Impact on chaperone function. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2, 10, 1403–1414.
- Selkoe, D.J. 2001. Alzheimer's disease. Genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 81, 2, 741–766.
- Shaulian, E., and Karin, M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology* 4, 5, E131-6.
- Sidera, K., and Patsavoudi, E. 2008. Extracellular HSP90. Conquering the cell surface. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 7, 11, 1564–1568.
- Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins. Activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 6, 959–962.
- Sorimachi, K., Akimoto, K., Hattori, Y., Ieiri, T., and Niwa, A. 1999. Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with polyanions, and involvement of interferon-gamma in the regulation of cytokine secretion. *Cytokine* 11, 8, 571–578.
- Sorkin, A., and Zastrow, M. von. 2009. Endocytosis and signalling. Intertwining molecular networks. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10, 9, 609–622.
- Spiess, C., Miller, E.J., McClellan, A.J., and Frydman, J. 2006. Identification of the TRiC/CCT substrate binding sites uncovers the function of subunit diversity in eukaryotic chaperonins. *Molecular Cell* 24, 1, 25–37.
- Spiess, M., Echbarhi, M., Svanström, A., Karlsson, R., and Grantham, J. 2015. Over-Expression Analysis of All Eight Subunits of the Molecular Chaperone CCT in Mammalian Cells Reveals a Novel Function for CCTdelta. *Journal of Molecular Biology* 427, 17, 2757–2764.
- Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F.U., and Pavletich, N.P. 1997. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex. Targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89, 2, 239–250.
- Sternlicht, H., Farr, G.W., Sternlicht, M.L., Driscoll, J.K., Willison, K., and Yaffe, M.B. 1993. The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 20, 9422–9426.
- Tchikov, V., and Schütze, S. 2008. Immunomagnetic isolation of tumor necrosis factor receptosomes. *Methods in Enzymology* 442, 101–123.
- Tsutsumi, S., Mollapour, M., Graf, C., Lee, C.-T., Scroggins, B.T., Xu, W., Haslerova, L., Hessling, M., Konstantinova, A.A., Trepel, J.B., Panaretou, B., Buchner, J., Mayer, M.P., Prodromou, C., and Neckers, L. 2009. Hsp90 charged-linker truncation reverses the functional consequences of weakened hydrophobic contacts in the N domain. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 11, 1141–1147.



- Unlü, M., Morgan, M.E., and Minden, J.S. 1997. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 11, 2071–2077.
- Valastyan, S., and Weinberg, R.A. 2011. Tumor metastasis. Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147, 2, 275–292.
- van Bezooijen, J.S., Prens, E.P., Pradeepti, M.S., Atiqi, R., Schreurs, M.W.J., Koch, B.C.P., van Gelder, T., and van Doorn, M.B.A. 2015. Combining biologics with methotrexate in psoriasis. A systematic review. *The British Journal of Dermatology* 172, 6, 1676–1680.
- Vassalli, P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annual Review of Immunology* 10, 411–452.
- Vaughan, C.K., Gohlke, U., Sobott, F., Good, V.M., Ali, M.M.U., Prodromou, C., Robinson, C.V., Saibil, H.R., and Pearl, L.H. 2006. Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 complex. *Molecular Cell* 23, 5, 697–707.
- Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., van Antwerp, D., and Miyamoto, S. 1995. Rel/NF-kappa B/I kappa B family. Intimate tales of association and dissociation. *Genes & Development* 9, 22, 2723–2735.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation* 10, 1, 45–65.
- Wandinger, S.K., Suhre, M.H., Wegele, H., and Buchner, J. 2006. The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *The EMBO journal* 25, 2, 367–376.
- Ware, C.F., Crowe, P.D., Vanarsdale, T.L., Andrews, J.L., Grayson, M.H., Jerzy, R., Smith, C.A., and Goodwin, R.G. 1991. Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 147, 12, 4229–4238.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 139, 5, 1281–1292.
- Yam, A.Y., Xia, Y., Lin, H.-T.J., Burlingame, A., Gerstein, M., and Frydman, J. 2008. Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies. *Nature Structural & Molecular Biology* 15, 12, 1255–1262.
- Yébenes, H., Mesa, P., Muñoz, I.G., Montoya, G., and Valpuesta, J.M. 2011. Chaperonins: two rings for folding. *Trends in Biochemical Sciences* 36, 8, 424–432.
- Yu, X., Jia, B., Wang, F., Lv, X., Peng, X., Wang, Y., Li, H., Wang, Y., Lu, D., and Wang, H. 2014. alpha(1) adrenoceptor activation by norepinephrine inhibits LPS-induced cardiomyocyte TNF-alpha production via modulating ERK1/2 and NF-kappaB pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 18, 2, 263–273.
- Zaza, G., Yang, W., Kager, L., Cheok, M., Downing, J., Pui, C.-H., Cheng, C., Relling, M.V., and Evans, W.E. 2004. Acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion has lower expression of genes involved in purine metabolism and lower de novo purine synthesis. *Blood* 104, 5, 1435–1441.

Zhang, M., Ko, K.H., Lam, Q.L.K., Lo, C.K.C., Xu, D.J.L., Shen, L., Zheng, B., Srivastava, G., and Lu, L. 2004. Novel function of TNF cytokines in regulating bone marrow B cell survival. *Cellular & Molecular Immunology* 1, 6, 447–453.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of Biological Chemistry*

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertaion selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen genutzt habe. Fremde Gedanken sind als solche direkt bei Übernahme kenntlich gemacht worden. Die Arbeit habe ich in gleicher oder vergleichbarer Form noch keinem Prüfungsamt vorgelegt. Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht worden in:

Fritsch, J., Fickers, R., Klawitter, J., Sarchen, V., Zingler, P., Adam, D., Janssen, O., Krause, E., and Schütze, S. TNF induced cleavage of HSP90 by cathepsin D potentiates apoptotic cell death. Oncotarget, 2016. doi:10.18632/Oncotarget.12411

---

**Ort, Datum**

---

**Unterschrift**

## **Lebenslauf**

Name : Jan Klawitter  
Geburtsort: Hamburg  
Geburtsdatum: 29.08.1977

## **Danksagung**

Bedanken möchte ich mich recht herzlich bei Professor Kabelitz für die Möglichkeit, in seinem Institut diese experimentelle Arbeit anfertigen zu dürfen und seine Hilfe bei der Themenwahl.

Mein Dank gilt ebenso allen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitgliedern dieses Institutes für die gelebte Kollegialität und freundschaftliche Institutsatmosphäre.

Besonders hervorheben möchte ich die beiden Personen, die mich in den vergangenen Jahren als wissenschaftliche Betreuer mit sehr großem persönlichem Engagement begleitet und unermüdlich unterstützt haben.

Zum einen ist dies Professor Stefan Schütze, dem ich für die kollegiale Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die großzügige materielle Versorgung und vorbildliche wissenschaftliche Betreuung hiermit meinen Dank aussprechen möchte.

Zum anderen danke ich Dr. Jürgen Fritsch aus dieser Arbeitsgruppe, der mir durch die gesamte Zeit im Institut bei hohem persönlichem Engagement in unterschiedlichsten wissenschaftlichen wie organisatorischen Problemlagen eine unschätzbare Hilfe war.